

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**



TESIS DOCTORAL

**Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y
de los productos de excreción-secreción de *Schistosoma
bovis*. Estudio de la interacción del parásito con el sistema
fibrinolítico del hospedador.**

ALICIA RAMAJO HERNÁNDEZ

Salamanca, 2008

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Dña. Alicia Ramajo Hernández ha disfrutado de una **Beca Predoctoral FPI** (Formación Personal Investigador), concedida por el **Ministerio de Educación y Ciencia**.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del proyecto AGL2003-04235 (2003-2006).



Los doctores Dña. ANA OLEAGA PÉREZ y D. RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ, Científicos Titulares del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (CSIC),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y de los productos de excreción-secreción de *Schistosoma bovis*. Estudio de la interacción del parásito con el sistema fibrinolítico del hospedador”, presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. **ALICIA RAMAJO HERNÁNDEZ**, ha sido realizada en la Unidad de Patología Animal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (CSIC) bajo nuestra dirección y cumple las condiciones para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, firman y sellan el presente certificado en Salamanca a 3 de Octubre de 2008.

Fdo. Dra. Ana Oleaga Pérez

Fdo. Dr. Ricardo Pérez Sánchez.



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA Y EDAFOLOGÍA-QUÍMICA AGRÍCOLA**

Julio López Abán, DNI 45417862S, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, de la Universidad de Salamanca.

INFORMA QUE:

D^a **Alicia Ramajo Hernández** ha realizado el trabajo titulado “Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y de los productos de excreción-secreción de *Schistosoma bovis*. Estudio de la interacción del parásito con el sistema fibrinolítico del hospedador”, bajo la dirección de los Drs. **Ana Oleaga Pérez** y **Ricardo Pérez Sánchez** y estimo como tutor que el mencionado trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo en Salamanca a veintitrés de septiembre de dos mil ocho.

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi gratitud a todas las personas e instituciones que, de alguna manera, han contribuido a la realización de esta tesis.

De forma especial agradezco a mis directores científicos, la Dra. Ana Oleaga Pérez y el Dr. Ricardo Pérez Sánchez, investigadores del Grupo de Parasitología Animal del IRNASA (CSIC), la proposición del tema, dirección del trabajo en toda su dimensión, elaboración de publicaciones y el adiestramiento que todo ello ha llevado implícito.

Quiero igualmente expresar mi reconocimiento al Dr. Julio López Abán, Profesor del Área de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, por aceptar y desempeñar la tutoría reglamentaria para el desarrollo y presentación de esta tesis.

Muy particularmente agradezco a mi padre, el Dr. Vicente Ramajo, investigador también del mencionado Grupo de Parasitología Animal del IRNASA (CSIC), sus consejos acerca de la iniciación en la investigación científica y sus enseñanzas sobre esquistosomosis y en general sobre Parasitología Veterinaria.

Asimismo agradezco a mis compañeras de laboratorio; la Dra. Siles Lucas, Ana Hernández, y muy especialmente a Olga Corona y Rocío Vizcaíno, las ayudas de todo tipo que siempre me han brindado. Gracias amigas!

Agradezco finalmente al Programa de Becas FPI del MEC y al IRNASA de Salamanca (CSIC), los soportes económico y científico que han posibilitado hasta ahora el progreso de mi formación investigadora y académica.

A mis padres.

A Luismi.

A Álvaro y al que viene de camino.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín difosfato.

AK: Adenilato cinasa.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATPGK: ATP:guanidino cinasa.

AV-PO: Avidina-peroxidasa.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CAA: Antígeno circulante anódico.

CCA: Antígeno circulante catódico.

CBendo: Catepsina B endopeptidasa.

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario.

CHAPS: Sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano.

CT: Citrato sintasa.

DTT: Ditionitritol.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

εACA: Ácido ε-aminocaproico.

FABP: Proteína unidora de ácidos grasos.

FbisPA: Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

Fuc: Fucosa.

F-LDN: $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1$.

F-LDN-F: $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4}(\text{Fuc}\alpha 1\text{-3})\text{GlcNAc}\beta 1$.

Gal: Galactosa.

GalNAc: N-acetilgalactosamina.

GAPDH: Gliceraldehído -3-fosfato-deshidrogenasa.

Glc: Glucosa.

GlcA: Ácido glucurónico.

GlcNAc: N-acetilglucosamina.

GP: Glucógeno fosforilasa.

GPI: Glicosil fosfatidil inositol.

GTP: Proteína transportadora de glucosa.

GST: Glutación-S-transferasa.

IEF: Isoelectroenfoque.

IPG: Gradiente de pH inmovilizado.

IRNASA: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca.

KLH: Keyhole Limpet haemocianin o Hemocianina de la lapa gigante californiana.

LDN: GalNAc β 1-4GlcNAc β 1.

LDN-F: GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1.

Le^X: Lewis^X.

Le^Y: Lewis^Y.

LNFPIII: Lacto-N-fucopentosa III.

MALDI-TOF: Ionización/desorción láser favorecida por matriz-tiempo de vuelo.

Man: Manosa

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem. Espectro de fragmentación de péptidos.

NCBI nr: National Center for Biotechnology Information non redundant database.

NTB: Nitroblue tetrazolium chloride.

OPD: Orto-fenil-diamina.

PBS: Tampón fosfato salino.

PBST: PBS con Tween-20 al 0,05%.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGM: Fosfoglicerato mutasa.

pI: Punto isoeléctrico.

p.i.: Postinfección.

PM: Peso molecular.

PMF: Mapa de huella peptídica.

PMSF: Sulfofluoro de metilfenilo.

Pre-prOSA: Pre-pro albúmina sérica ovina.

Sb28GST: Glutación S-transferasa de 28 kDa

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SGTP: Proteína transportadora de glucosa.

SMA 22.6: Antígeno de tegumento.

SOD: Superóxido dismutasa.

SPF: Surface protein fluke o proteína de superficie del verme.

TBS: Tris buffer salino.

TCA: Ácido tricloroacético.

TGR: Tioredoxina glutatión reductasa.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno.

TPI: Triosa fosfato isomerasa.

TRIS: Tris-hidroxi-metil-amino-metano.

Xyl: Xilosa.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
--------------------------------	---

REVISION BIBLIOGRÁFICA

1. <i>SCHISTOSOMA BOVIS</i> Y ESQUISTOSOMOSIS ANIMAL	9
1.1. HOSPEDADORES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	11
1.2. CICLO BIOLÓGICO	11
1.3. PATOLOGÍA Y CLÍNICA	13
1.4. RESPUESTA INMUNITARIA	16
1.5. DIAGNÓSTICO	18
1.6. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL	19
2. INTERFASE PARÁSITO-HOSPEDADOR	21
2.1. PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN	22
2.2. TEGUMENTO	23
3. GLICOBIOLOGÍA DE LOS ESQUISTOSOMAS	30
3.1. GLICANOS, GLICOMA Y GLICOPROTEOMA	30
3.2. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA	32
3.3. PATRONES DE EXPRESIÓN	36
3.4. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS GLICANOS	38
3.5. UTILIDAD DE LOS GLICANOS	40

4. INTERACCIÓN CON EL SISTEMA HEMOSTÁTICO DEL HOSPEDADOR.....	42
--	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL PARASITARIO

1. PARÁSITOS.....	49
2. HOSPEDADORES.....	49
3. MANTENIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>S. BOVIS</i> Y OBTENCIÓN DE VERMES ADULTOS.....	50
4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE VERMES ADULTOS DE <i>S. BOVIS</i>	52
5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE CERCARIAS Y HUEVOS DE <i>S. BOVIS</i>	53

II. ANÁLISIS DE LOS PROTEOMAS DE LOS EXTRACTOS ES Y TG

1. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	55
2. TINCIONES DE LOS GELES	60
3. ELECTROTRANSFERENCIA Y WESTERN BLOT	61
4. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES 2D.....	62
5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS) E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	63

III. ANÁLISIS DEL GLICOMA Y GLICOPROTEOMA DE LOS EXTRACTOS ES Y TG

1. ELECTROFORESIS MONO Y BIDIMENSIONALES.....	66
2. BLOTTING MONO Y BIDIMENSIONAL CON LECTINAS.....	67
3. WESTERN BLOT 1D	70
4. INMUNOPRECIPITACIÓN (IP).....	71
5. ELISA PARA COMPROBAR LA AUSENCIA DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS MONOCLONALES ANTI-Le ^x Y ANTI-Le ^y	72

6. ELISA CON LOS SUEROS DE CORDEROS INFECTADOS CON <i>S. BOVIS</i>	74
---	----

IV. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL TEGUMENTO PARASITARIO Y EL PLASMINÓGENO DEL HOSPEDADOR

1. UNIÓN DEL PLASMINÓGENO A PROTEÍNAS DEL TEGUMENTO	77
2. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO	79
3. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA UNIÓN DEL PLASMINÓGENO A LA SUPERFICIE DE LOS VERMES ADULTOS DE <i>S. BOVIS</i>	80
4. BLOTTING 2D CON PLASMINÓGENO E IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS PROTEÍNAS LIGADORAS DE PLASMINÓGENO	81

RESULTADOS

I. PROTEOMA DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN Y DEL EXTRACTO DE TEGUMENTO

1. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN (ES)	85
1.1. Electroforesis bidimensional del extracto ES.....	85
1.2. Proteínas antigénicas en el extracto ES.....	87
1.3. Análisis cuantitativo del extracto ES e identificación de las proteínas mayoritarias no antigénicas	90
2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL EXTRACTO DE TEGUMENTO (TG).....	92
2.1. Electroforesis bidimensional del extracto TG.....	92
2.2. Proteínas antigénicas en el extracto TG	93
2.3. Análisis cuantitativo del extracto TG e identificación de las proteínas mayoritarias no antigénicas	95

II. GLICOPROTEOMA DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN Y DEL TEGUMENTO

1. GLICOPROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LECTINAS EN EL EXTRACTO DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN (ES)	98
1.1. Western blot 1D con lectinas	98
1.2. Western blot 2D con lectinas e identificación de las glicoproteínas reconocidas	99

2. GLICOPROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LECTINAS EN EL EXTRACTO TG	105
2.1. Western blot 1D con lectinas	105
2.2. Western blot 2D con lectinas e identificación de las glicoproteínas reconocidas	106
3. GLICOPROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LECTINAS EN AMBOS EXTRACTOS.....	110
4. GLICOPROTEÍNAS RECONOCIDAS POR ANTICUERPOS ANTI-GLICANOS EN LOS EXTRACTOS ES Y TG.....	110
4.1. Western blot 1D con los anticuerpos anti-KLH, anti-Le ^X y anti-Le ^Y	110
4.2. Inmunoprecipitación e identificación de las glicoproteínas del extracto TG portadoras de grupos Le ^X y Le ^Y	111
5. RECONOCIMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE CERCARIAS Y HUEVOS DE <i>S. BOVIS</i> POR EL SUERO POLICLONAL ANTI-KLH.....	114
6. RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL ANTI-ES Y ANTI-TG Y PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-LE ^X Y ANTI-LE ^Y Y ANTI F-LDN (-F) EN EL SUERO DE CORDEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON <i>S. BOVIS</i>	115

III. INTERACCIÓN ENTRE EL TEGUMENTO DE *SCHISTOSOMA BOVIS* Y EL PLASMINÓGENO

1. UNIÓN DEL PLASMINÓGENO A LAS PROTEÍNAS DEL TEGUMENTO	119
1.1. ELISA	119
1.2. Blotting 1D con plasminógeno	120
2. EFECTO DEL EXTRACTO TG EN LA ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO.....	121
3. UNIÓN DEL PLASMINÓGENO A LA SUPERFICIE DE LOS VERMES	122
4. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS PROTEÍNAS FIJADORAS DE PLASMINÓGENO EN EL EXTRACTO TG	123

IV. RESUMEN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN *SCHISTOSOMA BOVIS*

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN	131
-----------------	-----

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.....	149
-------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.....	153
-------------------	-----

ANEXO. PUBLICACIONES

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los trematodos del género *Schistosoma* son una de las principales causas de enfermedad en los animales domésticos y el hombre en numerosos países tropicales y subtropicales. Hay tres especies principales de esquistosomas que parasitan a las personas -*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*- y al menos otras 10 que parasitan a rumiantes domésticos (Vercruysse y Gabriel, 2005). Entre estas últimas especies destaca *S. bovis* por los siguientes motivos.

En primer lugar, por su patogenicidad para los bovinos y ovinos domésticos, en los cuales provoca descensos en las tasas de crecimiento y productividad, y en casos de infección masiva la muerte, lo que se traduce en pérdidas significativas en las explotaciones ganaderas (De Bont y Vercruysse, 1998; Monrad et al., 2006). En segundo lugar, por su amplia distribución geográfica (África, Oriente Medio y gran parte de la cuenca mediterránea, incluida la Península Ibérica), que convierte a este parásito en un problema veterinario ampliamente extendido (Ramajo y Muro, 1997; Monrad et al., 2006). Y en tercer lugar, por las analogías inmunológicas y genéticas entre *S. bovis* y *S. haematobium* (Agnew et al., 1989; Webster et al., 2006), que hacen de *S. bovis* un modelo válido para el estudio de *S. haematobium*.

A pesar de su interés, *S. bovis* ha sido un parásito poco estudiado hasta la fecha, especialmente a nivel molecular. La mayoría de los trabajos publicados sobre *S. bovis* se han orientado hacia la epidemiología, ciclo de vida, patología y tratamiento de la infección (De Bont y Vercruysse, 1998). Sólo unos pocos trabajos han abordado el estudio de la inmunología de la infección por *S. bovis*, por lo que la información sobre los mecanismos inmunológicos implicados en este parasitismo es aun muy limitada (Vercruysse y Gabriel, 2005). Por su parte, los estudios en los que se ha llevado a cabo una caracterización molecular de *S. bovis* han sido muy minoritarios, sin tener como objetivo el análisis molecular sistemático de este parásito, sino la caracterización individual de determinadas proteínas, casi siempre por el interés de las mismas como antígenos vacunales, como por ejemplo la glutatión S-transferasa (Boulanger et al., 1999; De Bont et al., 2003) o la Sb14-3-3 (Siles-Lucas et al., 2007; Uribe et al., 2007).

En consecuencia, cabe afirmar que en *S. bovis* se desconoce prácticamente todo acerca de sus moléculas y, en particular, acerca de las moléculas implicadas en sus relaciones con el hospedador. El conocimiento de dichas moléculas es importante no sólo para comprender la biología de la relación parásito-hospedador, sino también

porque puede facilitar la identificación de antígenos parasitarios de interés vacunal, diagnóstico o de nuevas dianas para fármacos (Wilson et al., 2004).

Como ocurre con los esquistosomas que infectan a humanos, los vermes adultos de *S. bovis* sobreviven en el lecho vascular de sus hospedadores vertebrados durante varios años. Para lograr tan larga supervivencia, estos vermes deben modular no sólo la respuesta inmunitaria del hospedador sino también su respuesta hemostática.

Lógicamente, las moléculas parasitarias encargadas de llevar a cabo las funciones inmunomoduladoras y antihemostáticas han de estar entre aquellas que los esquistosomas exponen al hospedador a lo largo de la infección y, en lo que respecta a los vermes adultos, dichas moléculas son las expresadas en la superficie de su tegumento y las excretadas-secretadas durante sus procesos vitales.

En relación con la respuesta inmunitaria del hospedador, las moléculas desarrolladas por los esquistosomas para manipularla han sido ampliamente investigadas en los esquistosomas que infectan a humanos y, como resultado, existe abundante información sobre este tema (ver, por ejemplo, las revisiones de Pearce y MacDonald, 2002; Mountford, 2005; Secor, 2005). Entre otros aspectos se sabe que dichas moléculas son no sólo proteínas sino también glicanos, los cuales participan decisivamente en la inducción y modulación de la respuesta inmunitaria y en la inmunopatología de la esquistosomosis (Hokke et al., 2007a). Los glicanos de especies como *S. mansoni* y *S. japonicum* han sido objeto de numerosos estudios y actualmente se dispone de abundante información acerca de su composición y estructura. Sus funciones biológicas y la identidad de las glicoproteínas transportadoras son, sin embargo, mucho menos conocidas (Hokke et al., 2007a; Jang-Lee et al., 2007). Por el contrario, sobre los glicanos de *S. bovis* no existe información alguna.

En relación con la interacción entre los mecanismos hemostáticos del hospedador y los esquistosomas, son muy pocos los estudios que se han llevado a cabo. Se han identificado algunas moléculas de *S. mansoni* con potencial actividad antiagregante y anticoagulante, si bien nada se sabe acerca de la posible interacción entre los esquistosomas y el sistema fibrinolítico, del cual el plasminógeno es una pieza clave. El plasminógeno, tras su activación y transformación en plasmina es el encargado de degradar la fibrina evitando la formación de coágulos o deshaciendo los ya formados. Cabe suponer que los esquistosomas adultos podrían fijar y activar plasminógeno del hospedador sobre la superficie de su tegumento como vía para prevenir la formación de coágulos.

Teniendo cuenta lo anterior y ante la falta de información sobre *S. bovis* a nivel molecular se plantea como objetivo general de la presente tesis doctoral el iniciar la identificación y caracterización de las moléculas de *S. bovis* implicadas en las relaciones con el hospedador.

Para alcanzar este objetivo general nos hemos fijado los siguientes objetivos concretos:

- Primero, analizar los proteomas del tegumento y de los productos de excreción/secreción de los vermes adultos de *S. bovis* e identificar en ellos las proteínas más abundantes y las antigénicas.
- Segundo, caracterizar los glicanos expresados por los vermes adultos de *S. bovis* en sus glicoproteínas tegumentales y excretadas/secretadas e identificar las glicoproteínas portadoras de tales glicanos.
- Tercero, comprobar si en el tegumento de los vermes adultos se expresan proteínas ligadoras y activadoras de plasminógeno y, en su caso, identificar dichas proteínas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hemos estructurado este capítulo en cuatro grandes apartados. En el primero de ellos se hace una presentación general de *S. bovis* y de la esquistosomosis animal y en los tres siguientes se revisan los aspectos más directamente relacionados con los objetivos de esta tesis doctoral, como son: (i), la estructura, composición y funciones del tegumento y los productos de excreción-secreción de los esquistosomas; (ii), la estructura y funciones de los glicanos de los esquistosomas y (iii), la interacción entre los esquistosomas y el sistema fibrinolítico del hospedador.

1. *SCHISTOSOMA BOVIS* Y ESQUISTOSOMOSIS ANIMAL

La esquistosomosis es una enfermedad que puede afectar al hombre y a los animales domésticos y silvestres, constituyendo un importante problema sanitario y veterinario en muchas zonas tropicales y subtropicales del mundo.

Los esquistosomas son gusanos planos o Platelminotos, pertenecientes al género *Schistosoma*, que se encuadra dentro de la familia Schistosomatidae. Son trematodos dioicos y como todos los miembros de este grupo precisan un hospedador intermediario (un molusco) y un hospedador definitivo (un vertebrado) para completar su ciclo biológico. Los vermes adultos viven en el sistema vascular de sus hospedadores vertebrados, colonizando las venas perivesicales (*S. haematobium*), nasales (*S. nasale*) o hepáticas y mesentéricas (resto de las especies).

En la actualidad hay descritas 20 especies, de las cuales 5 son parásitas de humanos. En la Tabla 1 se recoge un listado con las especies de *Schistosoma* sp., indicando en la misma su distribución geográfica, sus hospedadores vertebrados y los géneros de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios (De Bont y Vercauteren, 1998; Ramajo Martín y Muro, 1999; Attwood et al., 2002).

La esquistosomosis del hombre constituye uno de los mayores problemas de salud pública en zonas tropicales y subtropicales, donde es endémica en más de 70 países y se estima que hay más de 200 millones de personas afectadas (Pearce y MacDonald, 2002). La infección humana se debe mayoritariamente a *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*, motivo por el cual son las especies que han sido objeto de la mayor parte de los estudios llevados a cabo. Por el contrario, las especies que afectan a los animales han sido mucho menos estudiadas, a pesar de ser una infección parasitaria frecuente, principalmente en bovinos de África y Asia, donde se calcula que

hay al menos 165 millones de animales afectados (De Bont y Vercruysse, 1997). Concretamente, de las 10 especies que afectan a rumiantes, las únicas que han recibido alguna atención, debido a su mayor importancia veterinaria, han sido *S. mattheei* y *S. bovis* (Vercruysse y Gabriel, 2005).

Entre las que parasitan a rumiantes *S. bovis* representa la especie modelo (Moné et al., 1999). Las infecciones por esta especie ocasionan, en la mayoría de los casos, una enfermedad crónica cuyo curso, por lo general, es subclínico, pero que a largo plazo provoca notables descensos en la productividad de los animales, generando cuantiosas pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas (Vercruysse y Gabriel, 2005; Moné et al., 1999).

Tabla 1. Especies del género *Schistosoma*, hospedadores y distribución geográfica.

Especies	Género de caracol	Hospedadores definitivos	Distribución
Grupo haematobium			
<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus</i>	Hombre, primates	África
<i>S. mattheei</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes, primates	África
<i>S. bovis</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes	África, Asia, Península Ibérica,
	<i>Planorbarius</i>		Islas mediterráneas
<i>S. curassoni</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes	África
<i>S. margrebowiei</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes, primates	África central
<i>S. leiperi</i>	<i>Bulinus</i>	Rumiantes	África central
<i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus</i>	Hombre	África
Grupo indicum			
<i>S. indicum</i>	<i>Indoplanorbis</i>	Rumiantes	India
<i>S. spindale</i>	<i>Indoplanorbis</i>	Rumiantes	India
<i>S. nasale</i>	<i>Indoplanorbis</i>	Rumiantes, roedores	India
<i>S. incognitum</i>	<i>Lymnaea radix</i>	Rumiantes, primates, roedores, cerdo, perro	India, Tailandia
Grupo japonicum			
<i>S. japonicum</i>	<i>Oncomelania</i>	Hombre, rumiantes, cerdo, perro, gato, roedores	Japón, China, Filipinas
<i>S. mekongi</i>	<i>Tricula</i>	Hombre, perro	Laos, Camboya, Filipinas
<i>S. sinensium</i>	<i>Tricula</i>	Roedores	Este de Asia
<i>S. malayensis</i>	<i>Robertsiella</i>	Roedores	Este de Asia
<i>S. ovuncatum</i>	<i>Tricula</i>	Roedores	Este de Asia
Grupo mansoni			
<i>S. mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i>	Hombre, primates, perro, gato, roedores	África, Sudamérica, Caribe
<i>S. rodhaini</i>	<i>Biomphalaria</i>	Roedores, perro	África
<i>S. edwardiense</i>	<i>Biomphalaria</i>	Hipopótamo	África
<i>S. hippopotami</i>	<i>Biomphalaria</i>	Hipopótamo	África

1.1. Hospedadores y distribución geográfica.

S. bovis utiliza como hospedadores definitivos a rumiantes, esencialmente vacas, ovejas y cabras, aunque también se ha encontrado en équidos, suidos, cánidos, camélidos, roedores y primates (Ramajo Martín, 1972). Los hospedadores intermediarios son caracoles acuáticos. Ramajo Martín (1972) señaló que el molusco que actúa como hospedador intermediario en España de manera exclusiva es *Planorbarius metidjensis* (Pulmonata, Planorbidae, Planorbinae), mientras que en otras zonas del mundo son especies del género *Bulinus* (Pulmonata, Planorbidae, Bulininae). Los hábitats preferidos por los *Planorbarius* son pequeños ríos, arroyos de aguas claras, manantiales superficiales y abrevaderos artificiales.

La distribución geográfica de *S. bovis* está determinada principalmente por la distribución de sus hospedadores intermediarios. *S. bovis* se encuentra en prácticamente todo el continente africano, Asia sudoccidental (Israel, Irán, Irak, Siria, Turquía), islas del Mediterráneo (Córcega, Cerdeña, Sicilia) y España (Ramajo Martín y Muro, 1999; Moné et al., 1999).

En España fue hallado por primera vez en ovejas de la provincia de Ávila (Sánchez Botija, 1954) y más tarde en bovinos, ovinos y caprinos de Salamanca (Simón Vicente, 1969). En los últimos años se ha seguido comprobando la endemidad de la esquistosomosis en rumiantes de Salamanca, predominantemente bovinos (Ramajo et al., 1995; López-Abán et al., 2004; Oleaga et al., 2004). También se registraron, hace años, infecciones muy focalizadas en ganado de Zamora, Córdoba, Badajoz y Cáceres (Simón Vicente y Ramajo, 1982; Mayoral et al., 1989), si bien no hay información sobre la situación actual en estas zonas.

Como norma general, en las áreas endémicas, la distribución de la esquistosomosis es muy focal debido no sólo a la distribución de los hospedadores intermediarios, los cuales colonizan hábitats muy concretos, sino también al restringido movimiento del ganado entre explotaciones (De Bont y Vercruysse, 1998).

1.2. Ciclo biológico.

El ciclo evolutivo completo de *S. bovis* fue descubierto por Brumpt (1930). Los vermes adultos son alargados, de 13-44 mm de longitud, y poseen una cutícula

resistente formada por un tegumento sincitial con una membrana externa, multilaminada, dotada de pequeñas espinas. Se dan más detalles sobre estructura y función del tegumento en el capítulo correspondiente (apartado 2.2.).

Los machos son más gruesos y robustos que las hembras, a las que alojan en un canal ventral o hendidura (*schistos*) que el propio macho posee en su cuerpo (*soma*), de aquí el nombre de *schistosoma*. El macho dispone de 3-6 testículos situados en su tercio anterior y la hembra de un ovario tubular en la mitad posterior, normalmente repleto de huevos. El acoplamiento entre machos y hembras es indispensable para la maduración somática y sexual de ambos sexos.

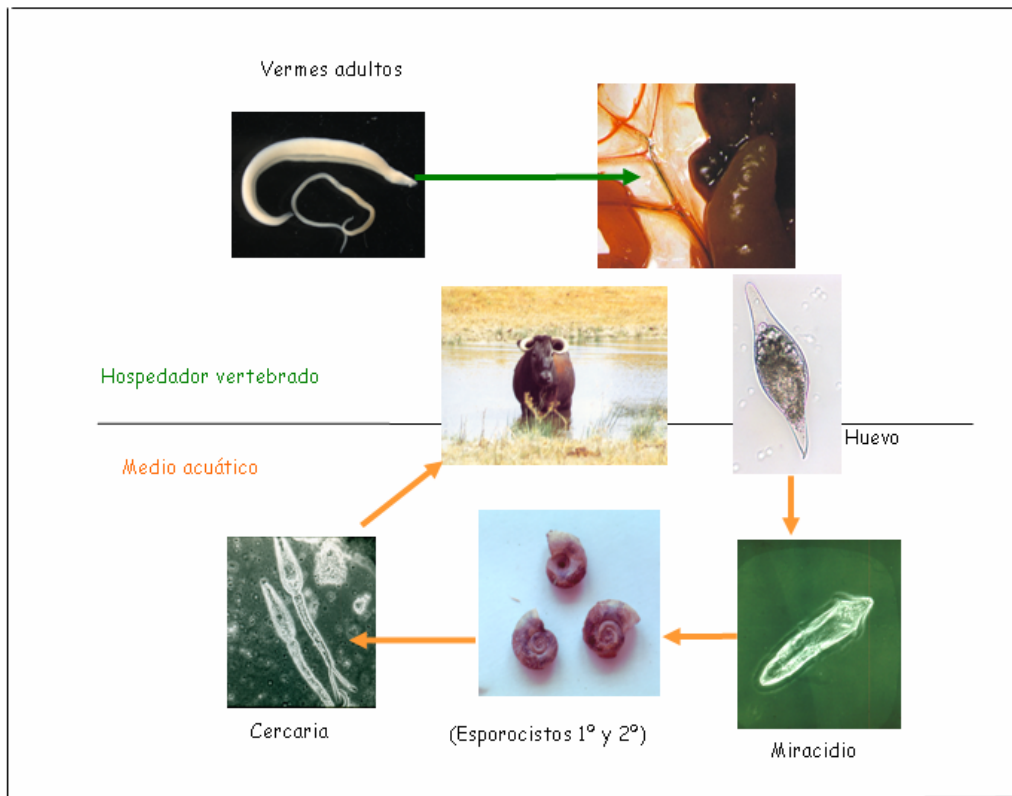
Las parejas de vermes adultos viven en las venas mesentéricas del hospedador, donde las hembras realizan la puesta de huevos. El huevo, que tiene una espina terminal, atraviesa las paredes vascular e intestinal, alcanza la luz intestinal y sale al exterior con las heces del hospedador. No está del todo claro qué mecanismo utilizan los huevos para atravesar el endotelio vascular, aunque parece ser que intervienen tanto determinadas enzimas líticas secretadas por el miracidio contenido en los huevos, como otros factores liberados por las plaquetas como consecuencia de la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador (Ngaiza y Doenhoff, 1990; De Bont y Vercruysse, 1998).

Una vez que el huevo ha salido al exterior, es preciso que se encuentre en un medio acuático, donde la luz y temperaturas de 20-30°C propician la eclosión de dicho huevo y la liberación del miracidio en menos de 30 minutos. El miracidio es una larva ciliada y móvil que, en el medio acuático, nada libremente durante algunas horas hasta alcanzar un molusco adecuado en el que penetra activamente. Durante el desarrollo intramolusco tiene lugar un proceso de multiplicación asexual en el que se forman esporocistos primarios en la glándula digestiva y secundarios en el hepatopáncreas. Estos últimos dan origen a nuevas larvas, las cercarias, que, una vez maduras abandonarán el molusco estimuladas por la temperatura y la luz. Este período de desarrollo intramolusco dura entre 17 y 120 días dependiendo de la temperatura del agua.

La cercaria, del tipo furcocercaria (cola bifurcada), una vez liberada en el medio acuático nada activamente durante unas horas, hasta encontrar un hospedador definitivo adecuado que haya tomado contacto con el agua contaminada. La cercaria puede permanecer viable hasta 40 horas, aunque su infectividad disminuye rápidamente. La vía natural de acceso activo más común es la percutánea, a través de la piel de las

extremidades u otras partes sumergidas y del entorno peribucal, pero puede hacerlo también de forma pasiva por la vía peroral o ingestión (Oleaga y Ramajo Martín, 2004).

Al atravesar la piel, la cercaria pierde la cola, elimina el glicocálix y se transforma en esquistosómula. Esta nueva fase evolutiva migra por las vías vascular y linfática hasta el pulmón y corazón izquierdo, desde donde se distribuye por la circulación arterial hasta el sistema porta-hepático y desde allí a las venas mesentéricas, donde se produce el apareamiento y la maduración sexual. El tiempo que tardan en alcanzar el estadio adulto y, en consecuencia, el comienzo de la puesta de huevos es de 40-45 días desde el inicio de la infección. En hospedadores altamente receptivos (vaca, oveja, cabra) pueden alcanzar el estadio adulto hasta un 60-70 % de las cercarias infectantes.



Cuadro 1. Ciclo biológico de *Schistosoma bovis*.

1.3. Patología y clínica

La esquistosomosis por *S. bovis* es una enfermedad crónica que causa importantes pérdidas en las explotaciones ganaderas por su efecto a largo plazo sobre el

crecimiento y la productividad de los animales y también por aumentar la susceptibilidad de los animales infectados a otras enfermedades parasitarias y bacterianas (De Bont y Vercruysse, 1998). En las áreas endémicas, esta parasitosis presenta altas prevalencias, pero las infecciones suelen ser de baja o moderada intensidad, cursando en la mayoría de los casos de forma subclínica (Vercruysse et al., 1985).

La gravedad de las lesiones, y en consecuencia de los síntomas, es proporcional a la intensidad de la infección (De Bont y Vercruysse, 1998). En los rumiantes la infección por *S. bovis* se caracteriza habitualmente por una exposición continua a un pequeño número de cercarias, aunque también pueden darse casos de infecciones masivas que llegan a producir la muerte de los animales (Lindberg et al., 1995).

Los daños más importantes debidos a la esquistosomosis están causados por los huevos que quedan alojados en los tejidos. Aunque algunos vermes adultos pueden morir en pulmones e hígado y originar lesiones focales, éstas en la mayor parte de los casos son poco numerosas y tienen una limitada importancia clínica comparada con la lesión causada por los millones de huevos producidos durante el curso de la infección.

La penetración de las cercarias y la migración de las esquistosómulas causan infiltración celular en torno a los puntos de contacto, intensa reacción linfocitaria y, ocasionalmente, hemorragias y granulomas incipientes en torno a esquistosómulas muertas.

Los efectos patógenos posteriores al período prepatente se deben fundamentalmente al paso de los huevos a través del hígado, tracto alimentario, pulmón y otros órganos (Ferrerías et al., 1998; Ramajo Martín y Muro, 1999; Ferrerías et al., 2000). Los huevos que quedan atrapados en los diferentes órganos y tejidos secretan diversos antígenos que producen una intensa reacción inflamatoria en torno a ellos que conduce a la formación de granulomas. Estos granulomas son áreas de intensa infiltración celular compuestos, principalmente, por eosinófilos, macrófagos, fibroblastos y linfocitos (El-Ansary, 2003). Cuando el huevo muere, el granuloma se resuelve dejando placas fibróticas en los órganos afectados. La mayor parte de las lesiones producidas por los huevos se localizan en la pared del intestino y en el hígado aunque en ocasiones, particularmente en infecciones masivas, se ven afectados otros órganos como pulmones, páncreas, preestómagos y abomaso (Hussein et al., 1975).

Paradójicamente, los granulomas que se forman en torno a los huevos también pueden tener un efecto protector. En ratones inmunodeprimidos, en los que no se

desarrollan los granulomas, se ha comprobado que tras la infección por *S. mansoni* los animales sufren un severo daño hepático como consecuencia del acúmulo de lípidos en los hepatocitos. Este fenómeno parece estar ocasionado por hepatotoxinas secretadas por los huevos, productos que en animales inmunocompetentes son neutralizadas por anticuerpos y secuestradas en el interior de los granulomas (Pearce & MacDonald, 2002).

En los animales afectados, el hígado se muestra endurecido y fibroso, con múltiples nódulos granulomatosos y venas portales dilatadas como consecuencia del acúmulo de trombos hemorrágicos. En el parénquima hepático y alrededor de los vasos sanguíneos se observan numerosas células mononucleares y polimorfos, así como zonas de degeneración celular entorno a los granulomas, fibrosis perilobular y una intensa reacción inflamatoria del tracto portal (Hussein, 1971).

En el tracto alimentario las lesiones se producen principalmente en intestino y recto. Los depósitos de huevos en la pared intestinal producen enteritis e infiltrados y granulomas en la mucosa, y en ocasiones en la serosa, con múltiples hemorragias. En el intestino delgado se produce una enteritis aguda caracterizada por un intenso exudado mucoso que contiene numerosos huevos y hematíes. Los ganglios mesentéricos presentan hipertrofia e hiperplasia linfo-reticular (Saad et al., 1980).

Cuando resultan afectados, los pulmones también pueden desarrollar granulomas, que aparecen acompañados por inflamaciones perivasculares y peribronquiales. Igualmente, el páncreas puede desarrollar granulomas parenquimatosos con degeneración de acinis (Hussein, 1971).

Clínicamente se distinguen dos síndromes, uno intestinal de evolución frecuentemente aguda y otro hepático con tendencia a la cronicidad.

La forma intestinal aparece a las pocas semanas de la infección, ocurre en el periodo de mayor eliminación de huevos en las heces y se atribuye al paso de un número elevado de huevos a través de la pared del intestino. Los animales muestran abatimiento, diarrea profusa, dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso. Simultáneamente se registra anemia, eosinofilia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipoproteinemia. Se ha observado, sin embargo, que la severidad de la diarrea no se correlaciona con el número de huevos eliminados, por lo que parece ser que también puede ser consecuencia de otros factores como una respuesta hiperreactiva del hospedador (Saad et al., 1980). Estos mismos autores atribuyen la anemia y la hipoalbuminemia a la intensa hemorragia intestinal. Los elevados niveles de globulinas

séricas son indicativos de una estimulación antigénica y el nivel de eosinófilos refleja el grado de respuesta inflamatoria provocada por el parásito (Lawrence, 1977).

El síndrome crónico hepático se manifiesta acrecentando la sintomatología de la forma intestinal excepto la diarrea. Se añaden además signos nerviosos, ictericia y nuevas alteraciones hematológicas como bilirrubinemia, uremia y elevaciones de las tasas de los indicadores de la funcionalidad hepática (Lawrence, loc. cit.).

1.4. Respuesta inmunitaria.

Como ocurre con otros aspectos, la mayor parte de los estudios sobre la inmunología de la esquistosomosis se han realizado con las especies de *Schistosoma* sp. que infectan a humanos, *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*, siendo muy escasos los trabajos efectuados con las especies de animales.

Aunque la información disponible sobre la inmunología de la infección por esquistosomas de humanos es enorme (ver las revisiones de Secor, 2005; Pearce y MacDonald, 2002), por no tener una relación directa con el objetivo de nuestro estudio, a continuación sólo describimos brevemente el modelo de respuesta inmunitaria que se produce en estas infecciones. Según se señala en la revisión de Pearce y MacDonald (2002), la respuesta inmunitaria que inducen las infecciones por *Schistosoma* sp. progresa a través de tres fases y la describen de la siguiente manera. Durante las 3-5 primeras semanas, en las que el hospedador está expuesto a la migración de las fases inmaduras, la respuesta inmunitaria es tipo Th1. A las 5-6 semanas de la infección, que es cuando el parásito madura, se empareja y comienza a producir huevos, el tipo de respuesta cambia drásticamente; disminuyen los componentes propios de las respuestas Th1 y, al mismo tiempo, aparece una intensa respuesta Th2 inducida por los antígenos secretados por los huevos. Durante la fase crónica de la infección (a partir de la semana 12 postinfección) la respuesta Th2 disminuye en intensidad y los granulomas que se forman en torno a los nuevos huevos son de menor tamaño que los de las fases precedentes.

Conviene mencionar que en el apartado 3.4. de esta revisión, en el que se describen las funciones de los glicanos de *Schistosoma* sp., se recoge el papel de los mismos en relación con algunos mecanismos inmunológicos observados en las infecciones por estos parásitos.

Respecto a la respuesta inmunitaria que inducen las infecciones por *S. bovis* se conocen algunas particularidades que señalamos a continuación.

La exposición continua al parásito induce en los rumiantes cierto grado de resistencia natural inmunomediada, que se traduce, por un lado, en descensos de la fertilidad de los vermes, disminuyendo así el número de huevos en las heces y en los tejidos, y por otro, en una mayor resistencia a la re-infección. No obstante, a pesar de la importancia que esta resistencia adquirida tiene en la regulación de la intensidad de las infecciones en el campo, apenas se sabe nada de los antígenos involucrados y de los mecanismos inmunológicos subyacentes (Vercruysse y Gabriel, 2005). Lo único que se conoce es que esta resistencia está mediada por anticuerpos y que no desaparece tras la eliminación de los vermes con praziquantel (Monrad et al., 1995, 2006).

También se ha comprobado, mediante la determinación de citocinas e isotipos/subclases de anticuerpos, que la respuesta inmunitaria frente a las infecciones por *S. bovis* en modelo murino es del tipo Th2, lo que coincide con lo indicado antes. Así mismo, y a diferencia de lo que ocurre en las infecciones por *S. mansoni*, en la inducción de la respuesta tipo Th2 intervienen además de los antígenos de los huevos otros procedentes de los vermes adultos (Viana da Costa et al., 1998).

En los animales infectados con *S. bovis* se da una transferencia de la inmunidad al feto y, en consecuencia, una mayor resistencia a las infecciones en los recién nacidos. Existe un traspaso prenatal, vía placentaria, y postnatal, vía calostrado, de antígenos y anticuerpos específicos. Este fenómeno también se ha observado en *S. mattheei* y *S. japonicum* (Vercruysse y Gabriel, 2005).

En varios trabajos se pone de manifiesto la existencia de una intensa respuesta humoral y se describe la cinética de anticuerpos en rumiantes frente a diferentes extractos antigénicos. En infecciones experimentales de cabras y ovejas se observa que el nivel de anticuerpos frente a los antígenos de adultos se eleva significativamente desde la semana 3-4 de la infección y frente a los de los huevos desde la semana 8. Esta respuesta humoral aumenta drásticamente después del tratamiento de los animales, lo que indica una estimulación inmune adicional por parte de los antígenos liberados por los vermes muertos (Johansen et al., 1996; Rodríguez Osorio et al., 1999). No obstante, hasta la fecha, no se ha llegado a caracterizar los antígenos del parásito implicados en estas respuestas.

Sobre los antígenos de *S. bovis* lo único que se conoce, ya desde hace tiempo, es que comparte antígenos con otras especies de esquistosomas, especialmente con *S.*

haematobium (Agnew et al., 1989; Losada et al., 2005). En relación con este hecho, en trabajos recientes se ha demostrado la utilidad de los antígenos de *S. bovis* para el diagnóstico de infecciones por *S. mansoni* y *S. intercalatum* (Belo et al., 2002; Pardo et al., 2004).

También se sabe que *S. bovis* tiene similitud antigénica con *Fasciola hepatica* (Hillyer et al., 1987) y que dicha semejanza da lugar al desarrollo de resistencia en infecciones cruzadas de ambos parásitos (Rodríguez Osorio et al., 1993).

1.5. Diagnóstico.

Las infecciones por esquistosomas no presentan, por lo general, síntomas característicos que sirvan para diferenciarlas de otros procesos infecciosos o parasitarios. Por lo tanto, la valoración del cuadro clínico no pasa de tener un valor orientativo.

El diagnóstico de la esquistosomosis animal se realiza habitualmente mediante técnicas coprológicas, identificando los huevos del parásito en muestras de heces. El recuento de los huevos es indicativo del nivel de infección. Aunque los métodos de diagnóstico coprológico resultan bastante laboriosos, son unas herramientas muy utilizadas en el campo veterinario (Olaechea et al., 1990). En los trabajos epidemiológicos, un problema que presentan estos métodos es que su sensibilidad disminuye con la edad de los hospedadores, hecho atribuido a la reducción inmunomediada de la fecundidad de los vermes. Como inconvenientes de estas técnicas de diagnóstico directo se señalan su baja sensibilidad respecto a otras y su ineficacia durante el periodo prepatente (Ramajo Martín y Muro, 1999).

Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de la esquistosomosis humana, habiéndose desarrollado diferentes pruebas para la detección tanto de anticuerpos como de antígenos circulantes (Mahmoud, 2001). Para la detección de anticuerpos frente a la infección se han utilizado diversos métodos, como la inmunofluorescencia, la hemaglutinación indirecta, la fijación del complemento y el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), con buenos resultados en general, aunque la sensibilidad depende en cada caso del antígeno utilizado. Sin embargo, el diagnóstico mediante la detección de anticuerpos no permite diferenciar las infecciones activas y las ya pasadas; tampoco es eficaz para la detección de infecciones recientes y no refleja el

grado de infección ya que no hay correlación entre la carga parasitaria y el nivel de anticuerpos (en De Bont y Vercruysse, 1998).

Con el fin de obviar estos inconvenientes también se han desarrollado métodos equivalentes para la detección de antígenos circulantes. Los antígenos circulantes anódico y catódico (CAA, CCA) son antígenos intestinales de esquistosoma que se liberan a la circulación con el vómito del parásito. Estos tests, basados en la técnica de ELISA, muestran una elevada sensibilidad y tienen la ventaja de que el nivel de los antígenos que se detecta en el suero refleja la carga parasitaria. No obstante, un aspecto a tener en cuenta es que los niveles de antígenos circulantes siguen un modelo estacional con un aumento significativo de los mismos cuando los animales están sometidos a estrés físico o nutricional, lo que implica que en estas situaciones los resultados pueden ser de difícil interpretación (De Bont y Vercruysse, 1998).

Los estudios más recientes están dirigidos al desarrollo de métodos moleculares para el diagnóstico específico del parásito en los hospedadores intermediarios y en los definitivos. Estos métodos están basados en la amplificación y detección de fragmentos de secuencias genéticas específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p.e.: Sandoval et al., 2006; Abbasi et al., 2007).

1.6. Tratamiento, prevención y control.

La prevención y control deben integrar medidas quimioterápicas con otras diseñadas para evitar la consecución del ciclo biológico del parásito (lucha contra intermediarios), así como el contacto de los hospedadores con las fases infectantes.

Obviamente, en muchas ocasiones es difícil evitar el contacto de los animales con aguas contaminadas por lo que para reducir el riesgo de infección se pueden aplicar medidas que disminuyan o eliminen las poblaciones de caracoles. Estas medidas van dirigidas a la introducción de cambios ambientales en los hábitats de los caracoles (drenaje de charcas), la utilización de métodos de control biológico (otros caracoles competidores) o la aplicación de molusquicidas (niclosamida) (Webbe y Jordan, 1993).

En cuanto al tratamiento de la esquistosomosis, antes del lanzamiento al mercado del praziquantel, hace más de 20 años, se utilizaron, en animales, diversos fármacos con probado efecto esquistosomicida pero que presentaban ciertos inconvenientes como la toxicidad o importantes efectos secundarios. Algunos de estos

fueron los antimoniales, la lucanthona e hycanthona, los isocianatos y el triclorfón (neguvon o metrifonato) (en De Bont y Vercruysse, 1998).

Actualmente, en el tratamiento de la esquistosomosis el praziquantel es el fármaco de elección. Es eficaz frente a todas las especies, apenas presenta efectos secundarios y se administra oralmente en una única dosis de 20-30 mg por kilo de peso (Cioli et al., 1995). El praziquantel aumenta el flujo de calcio a través del tegumento y provoca en el parásito una intensa contracción muscular y parálisis. En los vermes se observan alteraciones y daños en la superficie externa del tegumento lo que provoca que, tras el tratamiento, determinadas moléculas parasitarias queden expuestas a los efectores de la respuesta inmune. El fármaco actúa en colaboración con la respuesta inmunitaria del hospedador. En este sentido, se ha comprobado que el tratamiento con praziquantel induce cambios en el perfil antigénico reconocido por el sistema inmune del hospedador (Mutapi et al., 2005).

El desarrollo de algunas resistencias frente al praziquantel, debido a los continuos y masivos tratamientos, y el afán de disponer de fármacos alternativos hace que la búsqueda de nuevos fármacos sea un área de intensa investigación. Un ejemplo son los últimos ensayos con un oxidiazol, el Furoxan, que demuestra una elevada efectividad esquistosomicida frente a varias especies. Este fármaco actúa inhibiendo la tioredoxina glutatión reductasa, una enzima parasitaria que interviene en la eliminación de los radicales tóxicos del oxígeno (Sayed et al., 2008).

Por otra parte, el coste económico del tratamiento farmacológico de los animales y su ineficacia en algunas zonas endémicas debido a las altas tasas de reinfección (Geerts y Gryseels, 2000) así como a la ineficacia del tratamiento para mejorar la patología en fases crónicas, ha impulsado desde hace años la búsqueda de nuevos métodos de control. Por este motivo, la búsqueda de una vacuna eficaz ha sido el objetivo de diversos estudios. Aunque se han logrado importantes avances, su desarrollo aún se encuentra en fase experimental. Los primeros trabajos demostraron la eficacia del control inmunológico tras la inmunización de bovinos, en condiciones experimentales y de campo, con cercarias irradiadas de *S. bovis*. En estos ensayos se lograron reducciones del 60-80% en el número de huevos en heces y tejidos y en el recuento de vermes adultos (Majid et al., 1980; Bushara et al., 1978).

En los últimos años el interés se ha centrado fundamentalmente en la identificación de antígenos protectores definidos, por ser más fáciles de obtener, estandarizar y de administrar que las cercarias irradiadas. Una de las moléculas más

estudiadas es la glutatión-S-transferasa de 28 kDa de *S. bovis* (Sb28GST) (Capron et al., 1994). La inmunización con la Sb28GST, tanto nativa como recombinante, ha proporcionado resultados muy variables, aunque ambas han demostrado ser efectivas en la protección de vacas sometidas a infecciones leves con *S. bovis*. En este sentido, se ha comprobado que la vacunación con la Sb28GST tiene un efecto antifecundidad lográndose notables reducciones en el número de huevos en heces (89%) y en la tasa de huevos viables (93%). Resultados similares también se han obtenido frente a otras especies de esquistosomas animales, como *S. mattheei* y *S. japonicum* (ver revisión de Vercruysse y Gabriel, 2005).

Otra molécula recientemente ensayada ha sido la proteína 14-3-3 de *S. bovis*. Esta molécula interviene en importantes procesos de señalización celular y ya se ha comprobado que los homólogos de esta proteína producen, en ratones, diversos grados de protección frente a infecciones por *S. mansoni* (25-46%) (Schechtman et al., 2001), *S. japonicum* (34-45%) (Zhang et al., 2000) y *Echinococcus multilocularis* (97%) (Siles-Lucas y Gottstein, 2003). La inmunización de ratones con la proteína 14-3-3 de *S. bovis*, administrada con diferentes inmunomoduladores, proporciona una protección del 36-61% frente a infecciones por este parásito (Uribe et al., 2007).

Por último, también se ha demostrado la protección cruzada que proporciona la inmunización con moléculas de otros parásitos. Tal es el caso de las proteínas fijadoras de ácidos grasos (Fatty Acid Binding Protein, FABP) de *Fasciola hepatica*, con las que se han conseguido protecciones homólogas frente a *F. hepatica* y heterólogas frente a *S. bovis*. Tanto la proteína nativa de 12 kDa (Fh12) como la recombinante de 15 kDa (Fh15) inducen, en modelos experimentales, mecanismos efectores que reducen la carga parasitaria en el 87-96% y el 72% respectivamente (López-Abán et al., 1999, 2000).

2. INTERFASE PARÁSITO-HOSPEDADOR

Teniendo en cuenta el objetivo de este estudio, a continuación comentamos algunas particularidades sobre los dos compartimentos del parásito que participan en las relaciones parásito-hospedador, esto es, los productos de excreción-secreción y, fundamentalmente, el tegumento. La información que recogemos procede de estudios realizados en especies que infectan a humanos, esencialmente *S. mansoni* y *S. japonicum*, y nos limitamos a describir lo relativo a los vermes adultos ya que es la fase evolutiva que estudiamos en este trabajo.

2.1. Productos de excreción-secreción

Los esquistosomas, durante su estancia en el hospedador vertebrado, son metabólicamente activos y liberan/secretan moléculas desde sus superficies epiteliales. Los componentes excretados-secretados por el parásito son, por una parte, las moléculas liberadas a partir del tegumento y, por otra, el vómito, que contiene enzimas digestivas y productos de la digestión (Cutts y Wilson, 1997). Los vermes adultos regurgitan el contenido intestinal después de la digestión junto con constituyentes de la membrana intestinal.

La excreción-secreción de las cercarias, esquistosómulas y huevos ha sido objeto de diversos estudios (Harrop y Wilson, 1993; Knudsen et al., 2005; Curwen et al., 2006; Cass et al., 2007), a diferencia de lo que ocurre con los vermes adultos, sobre los que la información es más escasa. En los adultos, como veremos más adelante, la mayor parte de los trabajos, y en especial los más recientes, se han centrado en las moléculas que forman parte del tegumento, independientemente de que éstas sean o no liberadas al medio.

Los mayores problemas que presenta el estudio de los componentes excretados-secretados son esencialmente la dificultad de cultivar adecuadamente, *in vitro*, a los vermes adultos y el escaso material que se libera al medio. Además, los procedimientos empleados en las incubaciones han sido muy variados, lo que ha originado bastante disparidad en el material liberado y, en consecuencia, en los resultados obtenidos en su análisis (Cutts y Wilson, 1997).

Parece ser que la mayor parte de las proteínas excretadas-secretadas tras el cultivo *in vitro* de vermes adultos proceden del tegumento (Lewis y Strand, 1991). Cutts y Wilson (1997) identifican, en un sistema *in vivo*, 12 antígenos con pesos moleculares entre 14 y 208 kDa, de los cuales 4 son liberados a partir del tegumento y otros 4 a partir de la gastrodermis. Recientemente, Planchart et al. (2007) obtuvieron una preparación del “vómito” de vermes adultos de *S. mansoni* y evaluaron su composición bioquímica y capacidad antigénica. Observaron una mayor cantidad de carbohidratos que de proteínas y detectaron 3 actividades enzimáticas: cisteína-proteinasa, N-acetil- β -D-glucosaminidasa y fosfatasa alcalina. Esta última, sin embargo, parece ser una contaminación del tegumento. Dichos autores también observaron, mediante Western blot, la presencia de dos dobletes altamente inmunogénicos, de 31/32 y 38/40 kDa,

correspondiendo el primero, probablemente, a las cisteína-proteinasas intestinales cathepsina L1 y L2, ya identificadas en los productos de excreción-secreción de los vermes adultos (Brady et al., 2000).

2.2. Tegumento.

El tegumento o cubierta externa del parásito es la principal interfase entre este organismo y el medio externo. Dependiendo de la fase evolutiva del parásito, este medio externo puede ser el agua, el interior del caracol y los tejidos o el torrente sanguíneo del hospedador definitivo. La existencia de estos hábitats tan diferentes implica que el tegumento es una estructura dinámica y adaptable a las diferentes condiciones y requerimientos, y que su estructura y composición varían en las distintas fases evolutivas del parásito.

2.2.1. Estructura.

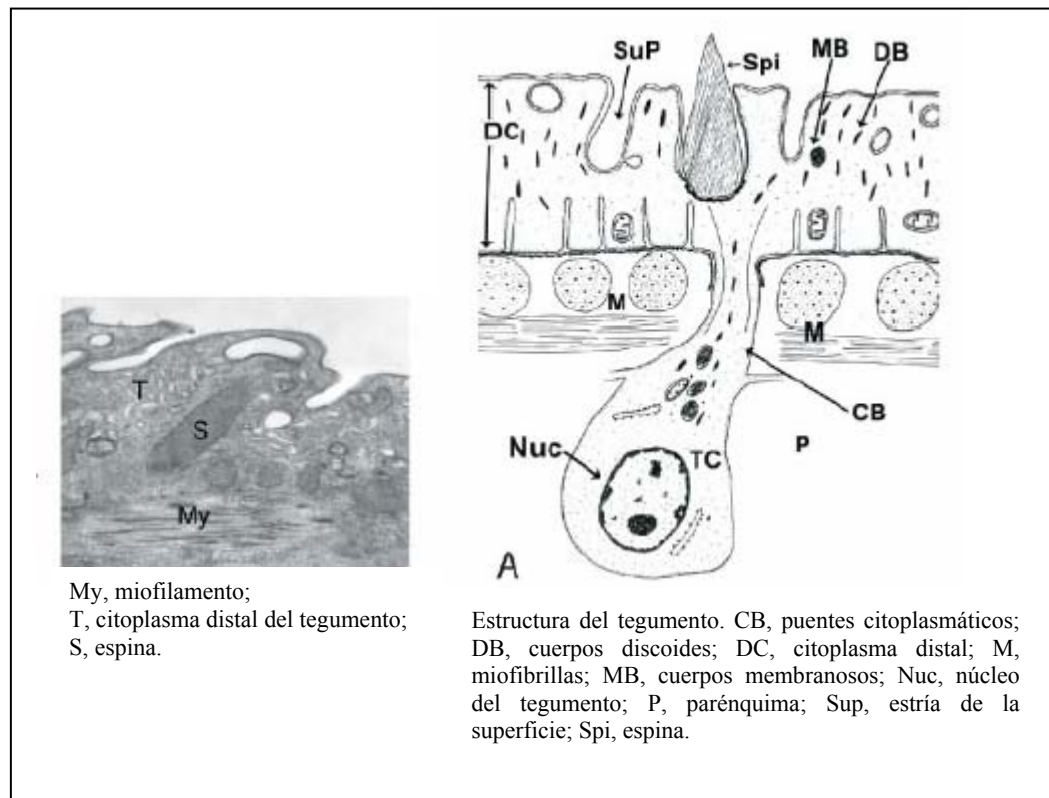
La superficie de los vermes adultos presenta un aspecto externo arrugado e irregular, con pequeñas protuberancias y estrías, pliegues, así como prominentes espinas superficiales.

El tegumento de los vermes adultos consiste en un citoplasma sincitial limitado externamente por una membrana. Esta membrana externa cubre completamente toda la superficie del tegumento, incluidas las espinas, y consiste en dos bicapas lipídicas estrechamente unidas, que al microscopio electrónico tienen el aspecto de una membrana heptalaminada. Esta doble bicapa lipídica está recubierta por un membranocálix secretado. El citoplasma del tegumento consiste en una matriz libre de ribosomas, que contiene alguna mitocondria y numerosas estructuras vesiculares, tales como los cuerpos elongados o discoides y los cuerpos multilaminares. Una membrana basal separa el sincitio citoplasmático de una capa de células musculares. El núcleo y los ribosomas del sincitio tegumental están en los cuerpos celulares, los cuales se localizan debajo de la capa muscular y se conectan a través de conexiones citoplasmáticas con el sincitio citoplasmático (Skelly y Wilson, 2006; van Hellemond et al., 2006).

Estos cuerpos celulares son responsables de la síntesis de los cuerpos membranosos, los cuales desempeñan un papel importante en la formación y reemplazo

de la doble membrana externa (MacGregor et al., 1988). El cambio o renovación *in vivo* de esta membrana externa se produce continuamente y según Saunders et al. (1987) tiene una vida media de 5 días.

La lámina basal, localizada entre el sincitio y la capa muscular, comparte muchas características estructurales con la de determinados tipos de células de mamíferos, tales como los glomérulos renales, lo que sugiere que tiene funciones de filtración (Gobert et al., 2003). La matriz sincitial contiene un citoesqueleto que conecta la membrana superficial externa con la lámina basal, lo que asegura la suficiente flexibilidad a la superficie de los esquistosomas. Además, el citoesqueleto constituye la base de las espinas que se encuentran en la superficie del tegumento (Jones et al., 2004).



Cuadro 2. Estructura del tegumento de *Schistosoma* sp. reproducido a partir de Jones et al. (2004).

La doble membrana externa (doble bicapa lipídica) es una estructura inusual, propia de la familia Schistosomatidae y de otras dos familias de trematodos sanguíneos, Aporocotylidae (parásitos de peces) y Spirorchiiidae (parásitos de tortugas). Por el

contrario, en otras especies de trematodos, que viven en el intestino y otras cavidades corporales, la membrana externa es diferente y está formada por una única bicapa lipídica. En consecuencia, se supone que esta particular estructura del tegumento de los esquistosomas es una adaptación para poder sobrevivir en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado (Abath y Werkhauser, 1996).

2.2.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria asociados al tegumento.

Los esquistosomas adultos viven durante años en el hospedador definitivo a pesar de la intensa respuesta inmunitaria que desencadenan. Para poder sobrevivir, el parásito ha desarrollado diversos mecanismos, la mayor parte de los cuales residen en el tegumento, con los que evita o modula a los efectores inmunitarios del hospedador. A continuación señalamos los principales mecanismos de evasión conocidos:

- Enmascaramiento y mimetismo antigénico.

El parásito adquiere e incorpora en su superficie tegumental diversas moléculas del hospedador. En diversos trabajos se ha demostrado la presencia de antígenos sanguíneos como A, B, H y grupos Lewis, productos del complejo mayor de histocompatibilidad, inmunoglobulinas, componentes del complemento, β_2 -microglobulina, α_2 -macroglobulina y una molécula similar al DAF humano (decay accelerating factor) (Loukas et al., 2001). De esta forma los antígenos parasitarios expuestos en la superficie quedan enmascarados y protegidos frente a la respuesta inmunitaria. Al mismo tiempo, la presencia del DAF en la superficie del tegumento puede servir para prevenir la amplificación de la cascada del complemento (Pearce et al., 1990).

Además de adquirir moléculas del hospedador, el parásito también es capaz de sintetizar moléculas similares a las del hospedador. Por ejemplo, se ha visto que determinadas moléculas de la superficie del parásito muestran reactividad cruzada con la α_2 -macroglobulina del hospedador (Abath y Werkhauser, 1996).

- Recambio de la membrana externa.

La continua eliminación y recambio de la membrana externa puede servir al parásito para eliminar anticuerpos adheridos a su superficie y evitar la respuesta inmunitaria mediada por estos anticuerpos (Pearce et al., 1986).

- Presencia de moléculas inmunomoduladoras.

La superficie de las esquistosómulas y de los vermes adultos está cubierta por numerosas moléculas parasitarias, algunas de las cuales pueden proteger al parásito de la repuesta inmunitaria del hospedador.

En diversos estudios *in vitro* se ha observado que los esquistosomas unen y neutralizan a componentes del sistema del complemento y que, además, disponen en su superficie de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, anulando de esta manera los mecanismos efectores mediados por anticuerpos.

También se ha observado que el parásito tiene capacidad para hidrolizar inmunoglobulinas y que, además, en este proceso se libera un tripéptido que interfiere con varias funciones de los macrófagos, tales como la citotoxicidad celular mediada por IgE, y con la formación del granuloma (Auriault et al., 1985).

Se han identificado diversas proteínas del tegumento con actividad inmunomoduladora de las que señalamos algunas de las mejor conocidas. Una de ellas es la paramiosina, una proteína, que forma parte del citoesqueleto de los esquistosomas, ampliamente estudiada por su interés como antígeno vacunal. Se sabe que esta proteína se une al componente C1q del complemento inhibiendo su activación (Laclette et al., 1992) y que actúa también como receptor de la porción Fc de los anticuerpos (Loukas et al., 2001).

La proteína denominada Sm60, unidora de manosa, tiene propiedades anti-inflamatorias e induce *in vitro* la migración de los neutrófilos y la desgranulación de los mastocitos (Coelho-Castelo et al., 2002). La Smpi56 es un inhibidor de serina proteasas, que bloquea la actividad proteolítica de la elastasa de los neutrófilos (Fishelson, 1995).

Otras moléculas que bloquean la respuesta inmune interactuando con componentes del sistema del complemento son: una molécula de 28kDa, que degrada los componentes iC3b, C3b y C9 y restringe el ataque de las células efectoras que utilizan receptores de complemento para identificar sus dianas (Fishelson, 1995); la P70 (70 kDa) que se une al componente C3b y bloquea la activación a nivel del C3; la SCP-

1 (94 kDa) que se une a los componentes C8 y C9 e impide la formación del complejo de ataque a la membrana (Fishelson, loc.cit.).

2.2.3. *Nutrición y tegumento.*

Aunque el parásito obtiene la mayor parte de los nutrientes mediante la ingestión de los eritrocitos, está claro que el tegumento participa activamente en la nutrición. La superficie tegumental tiene el aspecto de un epitelio digestivo-absorbedor presentando numerosos pliegues, tubérculos y espinas (Chappel, 1993).

Numerosos trabajos realizados en la década de los 70 demostraron que los esquistosomas realizan parte de su nutrición a través del tegumento transportando moléculas de pequeño tamaño. Este transporte puede ser pasivo, como se sabe que ocurre con muchos solutos y oligoelementos, o bien es un transporte activo, el cual requiere el concurso de moléculas específicas que lleven a cabo esa función. En este sentido, recientes trabajos sobre el proteoma del tegumento de *S. mansoni* han evidenciado la presencia en el tegumento de acuaporinas y de proteínas transportadoras de calcio, sodio, potasio, cobre y otros iones (Braschi et al., 2006a, 2006b).

El estudio de los mecanismos de absorción de la glucosa y los aminoácidos a través del tegumento ha permitido la identificación de algunas moléculas responsables de dicho transporte (Jones et al., 2004).

La captación de glucosa se realiza únicamente a través del tegumento a pesar de que los esquistosomas tienen una boca y un intestino funcional. La glucosa es transportada con la ayuda de unas proteínas transportadoras de glucosa (SGTPs). Skelly et al. (1998) han clonado y caracterizado tres SGTPs diferentes y han visto que dos de ellas, la SGTP1 y la SGTP4, se localizan en el tegumento, la primera en la membrana basal y la segunda en la membrana apical, y que cada una de ellas desempeña unas funciones específicas en el transporte de la glucosa.

Los esquistosomas incorporan unos aminoácidos a través de la pared intestinal (producidos en la hemoglobinolisis en el intestino) y otros a través de la pared del cuerpo. En la membrana apical del tegumento de adultos se ha identificado una permeasa de aminoácidos (SPRM11c) responsable de este transporte. Skelly et al. (1999) señalan que, probablemente, en la superficie de los vermes existan múltiples transportadores de aminoácidos y que la SPRM11c probablemente es responsable del transporte activo de aminoácidos básicos.

Las proteínas unidoras de ácidos grasos (Fatty acid binding proteins, FABPs) son proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de moléculas lipídicas. Puesto que los esquistosomas no pueden sintetizar *de novo* ácidos grasos de cadena larga y esteroides, parece ser que las FABPs desempeñan un papel importante en la adquisición de ácidos grasos a partir de la sangre del hospedador. Aunque diversos estudios inmunohistoquímicos discrepan acerca de la localización de estas moléculas en el tegumento (ver Gobert, 1998), Braschi et al. (2006b) han identificado recientemente por espectrometría de masas una FABP (la denominada Sm14) en el tegumento de *S. mansoni*.

2.2.4. Composición

En los apartados precedentes se ha adelantado cierta información sobre las moléculas que componen el tegumento por su papel en la nutrición del verme y en la neutralización de la respuesta inmunitaria del hospedador. En este apartado se completa la información relativa a la composición molecular del tegumento.

Dada la importancia de esta estructura en la supervivencia del parásito, son numerosos los trabajos llevados a cabo cuyo objetivo ha sido la identificación y caracterización de las moléculas del tegumento. La mayor parte de esos trabajos se han realizado en *S. mansoni* y han tenido como objetivo fundamental la búsqueda de moléculas de interés diagnóstico y vacunal (Abath y Werkhauser, 1996; Skelly y Wilson, 2006).

En la revisión de Abath y Werkhauser (1996) se hace una recopilación de los antígenos asociados al tegumento de *S. mansoni*, entre los que figuran varias proteínas con potencial valor vacunal. En este trabajo los autores ponen de manifiesto que la naturaleza de los antígenos del tegumento es muy variable y los agrupan en 3 bloques: (a) proteínas solubles asociadas a la superficie como la glutatión-S-transferasa (GST), triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato cinasa (PGK); (b) proteínas integrales de membrana unidas a la superficie mediante un anclaje glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) como las Sm32, Sm25 y el antígeno de 200 kDa o bien ancladas por uno o varios dominios transmembrana como la Sm23; y (c) proteínas resultantes de un procesamiento postransduccional diferencial a partir de un mismo precursor, como son la Sm15 y la familia antigénica A1.12/9.

Los mayores avances en la identificación de las proteínas tegumentales de *S. mansoni* se han conseguido en los estudios más recientes. Ello ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas de proteómica basadas en la espectrometría de masas, junto con la reciente secuenciación del transcriptoma y genoma de *S. mansoni* (www.schistoDB.org) (Verjovski-Almeida et al., 2003).

Los resultados de estos estudios están recogidos en varias revisiones (ver van Hellemond et al., 2006; Skelly y Wilson, 2006; Braschi et al., 2006b) por lo que nos limitaremos a señalar sobre los mismos los aspectos más relevantes.

En el primero de estos estudios, van Balkom et al. (2005), analizaron por espectrometría de masas dos subproteomas de los vermes adultos: un extracto del tegumento, aislado previamente, y un extracto de los “vermes pelados”. Las proteínas de cada fracción, tegumento y cuerpo “desnudo”, se separaron por electroforesis y cromatografía líquida y se identificaron mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS). De esta forma los autores identificaron 740 proteínas, de las que 149 estaban presentes a la vez en el cuerpo del verme y en el tegumento y 43 solamente en el tegumento. Considerando la clasificación funcional de las proteínas tegumentales identificadas, los autores señalan los siguientes aspectos: (i) el proteoma tegumental contiene, relativamente, pocas proteínas implicadas en la síntesis de ADN, ARN o proteínas, lo cual está de acuerdo con la ausencia de núcleo en el citoplasma distal del tegumento; (ii) el proteoma tegumental contiene un número elevado de proteínas de membrana y proteínas implicadas en el tráfico vesicular, lo cual no es sorprendente dado el intenso transporte de vesículas que contienen proteínas desde los cuerpos celulares hasta la membrana externa del tegumento; (iii), comparado con el proteoma del cuerpo de los vermes, las membranas tegumentales tienen muchas proteínas que no presentan homología con otras secuencias, lo cual apoya la idea de que el tegumento de los esquistosomas presenta unas funciones y estructura únicas.

En un estudio similar, Braschi et al. (2006b) analizaron únicamente el tegumento y obtuvieron una fracción enriquecida en membranas tegumentales. Las proteínas de estas membranas fueron fraccionadas, sobre la base de su solubilidad, en 4 fracciones que se analizaron por espectrometría de masas. En las tres primeras fracciones, las que contenían proteínas solubles, el análisis por espectrometría de masas identificó predominantemente proteínas citosólicas, citoesqueléticas y proteínas asociadas a membranas, respectivamente. En la cuarta fracción, la compuesta por proteínas insolubles, se identificaron proteínas transportadoras de azúcares, aminoácidos, iones y

otros solutos además de enzimas de membrana y proteínas relacionadas con la estructura de las membranas. Los autores agruparon las proteínas identificadas según sus posibles funciones y localización, basándose para ello en su homología con proteínas de otros organismos.

En un tercer estudio, cuyo objetivo fue la identificación de las proteínas expuestas en la superficie del tegumento de *S. mansoni*, Braschi y Wilson (2006) marcaron dichas proteínas con biotina en vermes adultos vivos. Las proteínas marcadas se purificaron mediante una columna de afinidad con estreptavidina y se identificaron por espectrometría de masas. Los autores identificaron 24 proteínas parasitarias: una proteína secretada (Sm29), 11 proteínas de membrana, 3 proteínas del citoesqueleto, tres proteínas citosólicas y 6 proteínas que no presentaron homología con otras secuencias conocidas. También encontraron en la superficie del tegumento inmunoglobulinas del hospedador y el componente C3 del complemento.

En conjunto, estos estudios han permitido la identificación de numerosas proteínas tegumentales con diversas funciones moleculares entre las que se encuentran proteínas implicadas en el metabolismo energético, enzimas antioxidantes, proteínas motoras, componentes del citoesqueleto, transportadores de nutrientes, iones y agua, enzimas de membrana y chaperonas que intervienen en las respuestas al stress y en el plegamiento proteico. Además se ha puesto de manifiesto la existencia de moléculas específicas del tegumento de esquistosoma, que no presentan homología con otras y cuya función se desconoce.

3. GLICOBIOLOGÍA DE LOS ESQUISTOSOMAS

3.1. Glicanos, glicoma y glicoproteoma

La glicobiología aplicada a los esquistosomas aborda el estudio de la estructura, patrones de expresión y funciones de los glicanos de estos organismos, entendiendo por glicanos los carbohidratos heteropoliméricos que constituyen la parte sacarídica de sus glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) (Taylor y Drickamer, 2003).

Al conjunto de estos glicanos en una determinada especie, fase evolutiva, órgano o tipo celular se denomina glicoma, y glicoproteoma al conjunto de las glicoproteínas de las que forman parte dichos glicanos.

Como ya se mencionó en la introducción, la glicobiología de *S. bovis* es un campo inédito, sobre el que no existe información previa. Por este motivo, y para contextualizar los hallazgos de la presente tesis doctoral, revisamos en su lugar la información disponible sobre la glicobiología de los esquistosomas que infectan a las personas.

Es bien sabido que los glicanos de los esquistosomas desempeñan funciones importantes en la biología del parásito y en la interacción parásito-hospedador, especialmente en la inducción y modulación de la respuesta inmunitaria y en la inmunopatología de la esquistosomosis (Hokke y Deelder, 2001, Nyame et al., 2003, 2004; Hokke y Yazdanbakhsh, 2005; Jang-Lee, 2007). Es por esto que la glicobiología de los esquistosomas se ha convertido en un área de creciente interés y en los últimos años han proliferado los estudios acerca de los glicanos y glicoconjugados de estos patógenos.

De las tres especies de esquistosomas que parasitan a las personas, la más investigada en el campo de la glicobiología ha sido *S. mansoni* (Hokke et al., 2007a, 2007b) seguida, a distancia, por *S. japonicum* (Khoo et al., 1997, 2001a, 2001b). Aunque los datos disponibles para *S. japonicum* son aun bastante fragmentarios, muestran que, salvo pequeñas diferencias, esta especie expresa un patrón glicánico similar al de *S. mansoni*. Por su parte, los glicanos de *S. haematobium* han sido muy poco investigados y la información disponible es escasa (Nyame et al., 1998). Consecuentemente, los datos que se exponen más adelante proceden mayoritariamente de *S. mansoni* y en mucha menor medida de *S. japonicum* y *S. haematobium*.

Hasta la fecha, la mayor parte de las investigaciones sobre la glicobiología de *S. mansoni* se han llevado a cabo con extractos completos de distintas fases evolutivas del parásito (ver Hokke et al., 2007a), ocasionalmente con secreciones de adultos, cercarias y huevos (ver Hokke et al., 2007b y Jang-Lee et al., 2007), y sólo excepcionalmente con una glicoproteína purificada, la glicoproteína inductora de interleucina-4 (IPSE/ α -1), segregada por los huevos (Wuhrer et al., 2006).

En conjunto, dichas investigaciones se han centrado principalmente en averiguar la composición y estructura de los glicanos, así como sus patrones de expresión en función del sexo, la fase evolutiva y los tejidos del parásito, utilizando para estos propósitos la espectrometría de masas y los métodos histoquímicos basados en el uso de

lectinas y anticuerpos monoclonales anti-carbohidratos como sondas específicas (Hokke y Deelder, 2001, Hokke et al., 2007a).

Aunque estos estudios han proporcionado abundante información en relación con la composición y estructura de sus glicanos, el conocimiento del glicoma y del glicoproteoma de *S. mansoni* (y de las otras especies de *Schistosoma* sp.) aun dista mucho de estar completo. En este sentido conviene señalar que: (i), la información es escasa o falta por completo para algunas fases evolutivas (Hokke et al., 2007a); (ii), salvo excepciones, se desconoce la identidad de las glicoproteínas portadoras de los glicanos (Hokke y Yazdanbakhsh, 2005, Jang-Lee et al., 2007) y (iii) para la mayoría de los glicanos se desconoce su función concreta porque, a diferencia de lo que ocurre con las proteínas, actualmente el simple conocimiento de su secuencia no ofrece ninguna pista acerca de su función o papel biológico (Hokke et al., 2007a).

A continuación ofrecemos una revisión de las principales estructuras glicánicas de los esquistosomas, de sus patrones de expresión y de sus posibles funciones biológicas y potencial utilidad.

3.2. Composición y estructura.

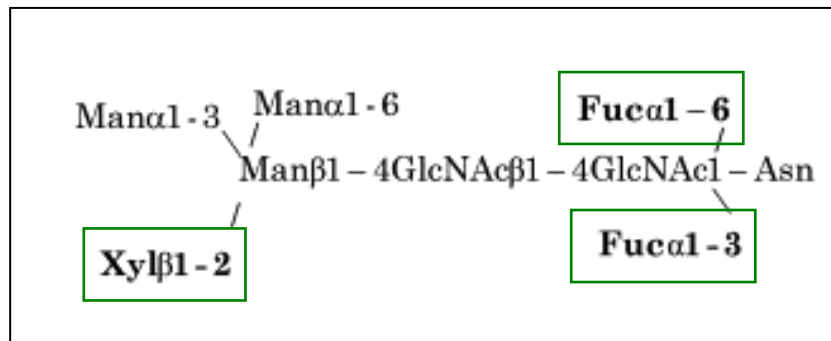
Los esquistosomas pueden sintetizar una amplia variedad de estructuras glicánicas. Cada una de estas estructuras es expresada siguiendo un patrón distinto, que varía en función de la especie, fase evolutiva, sexo y tejido del verme. Esto genera unos perfiles de expresión glicánica variados y complejos, lo que dificulta su descripción sistemática y limita el establecimiento de generalizaciones. Por este motivo, lejos de hacer una exposición exhaustiva de todo lo averiguado hasta la fecha, nuestra intención es mostrar solamente los datos que puedan ser más relevantes en relación con el objetivo de nuestro estudio.

Los glicanos de los esquistosomas están compuestos por un número relativamente limitado de monosacáridos: tres hexosas, manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc); una desoxihexosa, fucosa (Fuc); una pentosa, xilosa (Xyl); dos N-acetilhexosaminas, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilgalactosamina (GalNAc), y un ácido urónico, el glucurónico (GlcA). A diferencia de los mamíferos, los esquistosomas no incluyen ácido siálico en sus glicanos (Nyame et al., 1998; Hokke y Deelder, 2001).

Los monosacáridos anteriores se combinan componiendo heteropolímeros que son expresadas formando parte de glicoproteínas y glicolípidos. Estos heteropolímeros, a los que llamamos glicanos, cuando están conjugados con proteínas pueden ser de dos tipos estructuralmente distintos, N-glicanos y O-glicanos, tal como ocurre en los mamíferos.

Los N-glicanos de los esquistosomas constan de un núcleo central y de un conjunto de motivos o grupos terminales (constituidos por unos pocos monosacáridos) unidos al núcleo.

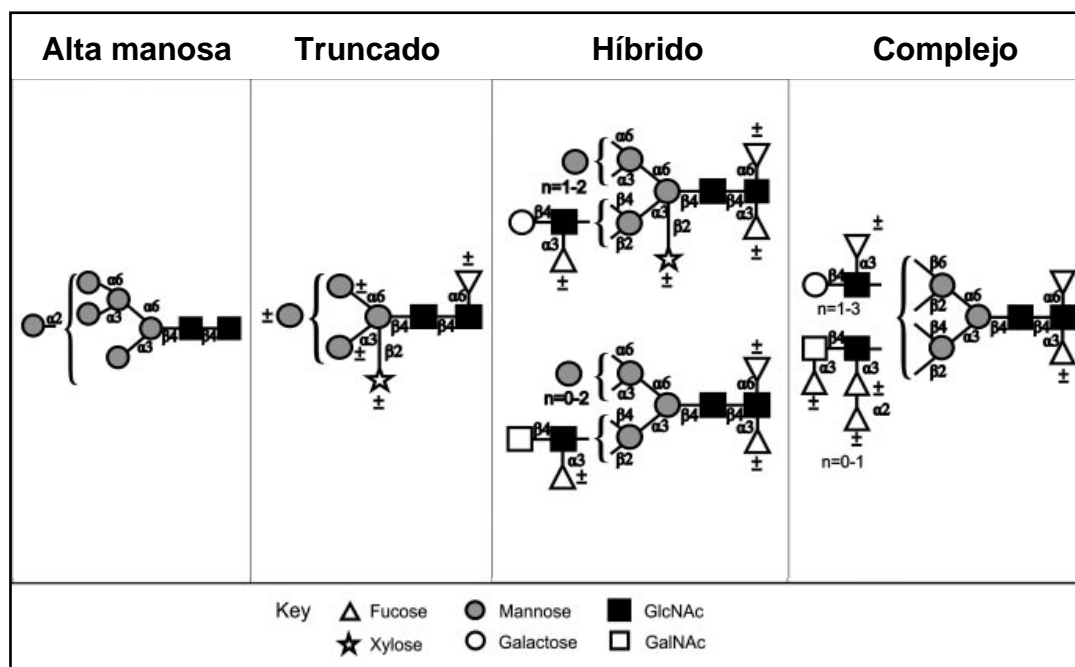
El núcleo N-glicánico de los esquistosomas es el mismo que el de los mamíferos, el denominado núcleo de chitobiosa (Cuadro 3), que está unido a la correspondiente asparagina mediante un enlace N-glicosídico ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$).



Cuadro 3. Núcleo de chitobiosa y sus modificaciones.

Dependiendo de la fase evolutiva y la especie de *Schistosoma*, este núcleo puede estar modificado individual o simultáneamente con una xilosa y/o una o dos fucosas, formando otros núcleos N-glicánicos, los denominados núcleos fucosaa3 ($\alpha 3\text{-Fuc}$), fucosaa6 ($\alpha 6\text{-Fuc}$) y xilosa $\beta 2$ ($\beta 2\text{-Xyl}$) (Cuadro 3). Estos núcleos modificados también existen en otros invertebrados y en plantas, pero no en mamíferos (Jang-Lee et al., 2007).

Los residuos de manosa del extremo no reductor de estos núcleos N-glicánicos pueden permanecer sin sustituciones adicionales o, más habitualmente, presentar sustituciones con cadenas adicionales de oligomanosa y/o con diversos motivos terminales generando así un variado conjunto de N-glicanos que se clasifican según su estructura final en: truncados, de alta manosa, híbridos y complejos (Cuadro 4).



Cuadro 4. Tipos de N-glicanos expresados por *Schistosoma* sp. según Jang-Lee et al. (2007).

Los motivos terminales más habituales en los N-glicanos de los esquistosomas son los que se describen en el en el cuadro 5.

Buena parte de estos motivos terminales, como GalNAc β 1-4GlcNAc β 1 (LDN), GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (LDN-F), Fuc α 1-3GalNAc β 1-4GlcNAc β 1 (F-LDN), Fuc α 1-3GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (F-LDN-F), Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (Lewis^X, Le^X) y poli-Le^X, también pueden encontrarse formando parte de los O-glicanos e incluso de los glicolípidos (en este caso, todos los señalados salvo el poli-Le^X) de *Schistosoma* sp. (Nyame et al., 1999, 2004; Hokke y Delder, 2001; Hokke et al., 2007b).

LDN	$\text{GalNAc}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}^b$
LDN-F	$\text{GalNAc}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}$ $\text{Fuca}1 - 3$
F-LDN	$\text{Fuca}1 - 3\text{GalNAc}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}$
DF	$\text{Fuca}1 - 2\text{Fuca}1 - \text{R}$
DF-LDN-DF ^c	$\text{Fuca}1 - 2\text{Fuca}1 - 3\text{GalNAc}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}$ $\text{Fuca}1 - 2\text{Fuca}1 - 3$
LN	$\text{Gal}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}$
LeX	$\text{Gal}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}$ $\text{Fuca}1 - 3$
Poly-LeX	$[-3\text{Gal}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1]_n - \text{R}$ $\text{Fuca}1 - 3$
Pseudo-LeY	$\text{Fuca}1 - 3\text{Gal}\beta 1 - 4\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{R}$ $\text{Fuca}1 - 3$
CAA	$[-6\text{GalNAc}\beta 1]_n - \text{R}$ $\text{GlcA}\beta 1 - 3$

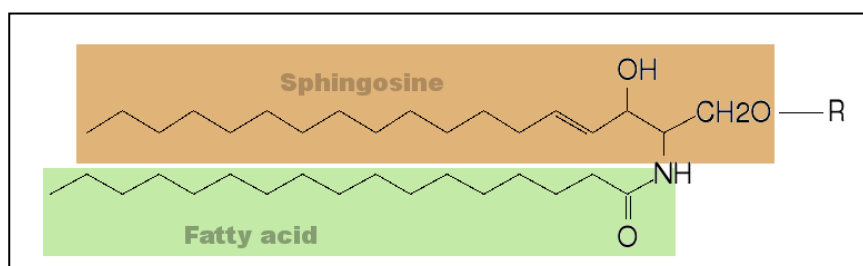
Cuadro 5. Motivos glicánicos terminales habitualmente expresados por los esquistosomas en sus glicoproteínas y glicolípidos según Hokke et al. (2007b).

Los O-glicanos de los esquistosomas presentan estructuras muy distintas de los N-glicanos. Su complejidad estructural es muy variable y pueden ser desde O-glicanos simples, tipo mucina, como $\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$, $\text{GalNAc}\beta 1\text{-Ser/Thr}$ y $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$ -también presentes en mamíferos-, hasta O-glicanos complejos multifucosilados, algunos de los cuales presentan elementos estructurales específicos de los esquistosomas. Estos O-glicanos complejos están formados por repeticiones de un núcleo trisacárido ($-3\text{GalNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\alpha -$)_n, sustituido en la GlcNAc interna y/o en la GalNAc terminal con cadenas laterales de $\text{Fuca}1\text{-2Fuca}1\text{-2Fuca}1\text{-3}$.

Otros O-glicanos bien conocidos en los esquistosomas son los presentes en dos glicoproteínas secretadas desde el intestino de los vermes adultos, las denominadas antígeno circulante catódico (CCA) y antígeno circulante anódico (CAA). Los O-glicanos del CCA están formados por multímeros del antígeno Le^x (poli- Le^x), similares

a los presentes en los N-glicanos de tipo complejo, mientras que el O-glicano del CAA es un glicosaminoglicano constituido por un polímero lineal de GalNAc β 1-6 en el que todos los monosacáridos están sustituidos en el carbono 3 con GlcA β 1 (Nyame et al., 1999, 2004; Hokke y Deelder, 2001, Hokke et al., 2007b).

En cuanto a los glicolípidos sintetizados por los esquistosomas, éstos son básicamente ceramidas, tanto ceramidas simples (ceramida-Gal o ceramida-Glc) como ceramidas complejas constituidas por el denominado “esquistonúcleo” (GalNAc β 1-4Glc-ceramida) (Cuadro 6). Este esquistonúcleo puede estar muy modificado con elementos glicánicos adicionales: algunos de ellos también presentes en los N- y O-glicanos, como los señalados previamente, y otros expresados exclusivamente en glicolípidos, como por ejemplo el antígeno pseudo-Le^Y (Fuc α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1), que hasta la fecha sólo se ha encontrado en los glicolípidos de las cercarias de *S. mansoni* (Cuadro 5) (Hooke y Delder, 2001; Hokke et al., 2007b).



Cuadro 6. Ceramidas expresadas por los esquistosomas. R, elemento glicánico

3.3. Patrones de expresión.

La comprensión de la glicobiología de los esquistosomas requiere conocer no sólo la estructura de los glicanos, sino también el momento y el lugar en que son expresados, es decir, en qué glicoproteínas o glicolípidos, en qué tejido, si son de superficie o secreción y si son expresados por una única fase evolutiva o por varias de ellas.

A modo de resumen, la tabla 2 muestra el patrón de expresión de los glicanos más habituales en las fases evolutivas que se desarrollan en el hospedador definitivo. Todos los glicanos recogidos en esta tabla intervienen en la respuesta inmunitaria del hospedador como antígenos o como inmunomoduladores (Hokke et al., 2007b).

Tabla 2. Elementos glicánicos con actividad inmunogénica o inmunomoduladora expresados por las fases evolutivas de *S. mansoni* que interactúan con el hospedador vertebrado.

Fase evolutiva	Elemento expresado ^a	Glicoconjugado portador ^b	Expresión en superficies	Expresión en secreciones
Cercaria	LDN	P	Ventosa oral	ND ^c
	F-LDN	P, L	ND	ND
	LDN-F	P	Parcial	ND
	DF-LDN-DF y variantes	P, L	General	ND
	Le ^x	P, L	Ventosa oral	ND
	Pseudo-Le ^y	L	ND	ND
	Núcleo-Fucα6	P	ND	ND
	Núcleo-Xilβ2	P	ND	ND
Esquitosómula de 3 horas	LDN	P	General	ND
	LDN-F	P	General	ND
	Le ^x	P	General	ND
Vermes adultos	LDN	P	Tegumento	ND
	F-LDN	L	No	ND
	LDN-F	P, L	Tegumento (macho)	ND
	DF-LDN-DF y variantes	P, L	ND	ND
	Le ^x	P, L	Tegumento (hembra)	ND
	Poli-Le ^x	P	Intestino	Sí
	CAA	P	Intestino	Sí
	Manosídico	P	ND	ND
Huevo	LDN	P, L	Cubierta	Sí
	F-LDN	P, L	Cubierta	Sí
	LDN-F	P, L	Cubierta	Sí
	DF-LDN-DF y variantes	P, L	Cubierta	Sí
	Le ^x	P	Cubierta	Sí
	Núcleo-Fucα3	P	ND	Sí
	Núcleo-Fucα6	P	ND	Sí
	Núcleo-Xilβ2	P	ND	ND

^a La ausencia de un elemento en esta columna no significa que no esté presente en esta fase evolutiva, solo que no ha sido encontrado (o buscado) hasta la fecha.

^b P, presente en glicoproteínas; L, presente en glicolípidos. En el caso de las glicoproteínas, los elementos terminales pueden estar presentes como N-glicanos, O-glicanos o ambos. Las modificaciones del núcleo de chitobiosa forman parte siempre de los N-glicanos.

^c ND, dato no disponible.

De lo expuesto en esa tabla pueden deducirse algunos comentarios, como los siguientes:

1. Resulta obvio que muchas de estas estructuras glicánicas, y en particular los elementos terminales, como por ejemplo LDN, F-LDN(-F) y Le^x, aparecen formando parte de diversos glicoconjugados que son expresados simultáneamente por varias, sino todas, las fases evolutivas. Como estos grupos son antigénicos, esto explica, al menos

en parte, la reactividad cruzada inmunológica que existe entre las diversas fases parasitarias (Hokke y Deelder, 2001).

2. Es llamativo el hecho de que estos glicanos suelen ser expresados en cada una de esas fases evolutivas en un compartimento anatómico o tejido distinto. Por ejemplo, el LDN es expresado en la ventosa oral en las cercarias, en todo el cuerpo en las esquistosómulas, en el tegumento en los adultos, y en las secreciones y en la cubierta en los huevos. Esta expresión diferencial parece indicar qué compartimento anatómico del parásito interactúa con el hospedador en cada fase del ciclo biológico.

3. Por el contrario, otros elementos glicánicos son expresados solamente por una determinada fase evolutiva, lo que tal vez indica que desempeñan funciones específicas en la interacción de esa fase evolutiva con el hospedador.

Junto a lo anterior hay que añadir que también se han observado diferencias en los patrones de glicosilación de machos y hembras tanto en el perfil de los glicanos expresados como en el de las glicosiltransferasas implicadas en su síntesis (revisado por Hokke et al., 2007b). Las hembras producen una mayor proporción de glicanos altamente ramificados (N-glicanos complejos y de alta manosa), mientras que los machos expresan un mayor número de glicanos truncados. En las hembras son más frecuentes los elementos glicánicos terminados en Gal β 1-4 (LacNAc y Le^X) y en los machos los terminados en GalNAc β 1-4 (LDN y LDN-F).

Estas diferencias son particularmente evidentes en el tegumento, tal como se ha observado en estudios por inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales anti-Le^X y anti-LDN-F: Le^X sólo se observa en el tegumento de las hembras y LDN-F en el tegumento del canal ginecóforo de los machos.

Se desconoce la razón de estas diferencias pero se las supone relacionadas con la interacción entre sexos y/o con la interacción de cada sexo con el hospedador.

3.4. Función biológica de los glicanos.

Respecto a las funciones desempeñadas por los glicanos, este es un campo muy poco explorado aun y, salvo excepciones, se puede decir que para la mayoría de ellos se desconocen. Comentamos a continuación el posible papel biológico de los glicanos incluidos en la tabla 2, señalando primero que, si bien se sabe que todos ellos intervienen en las relaciones inmunológicas con el hospedador (Hokke et al., 2007b),

sus funciones específicas y el mecanismo inmunológico subyacente son, en general desconocidos, aunque para algunos sí se dispone de información más precisa. Veamos algunos ejemplos.

3.4.1. *Glicanos con actividad inmunomoduladora.*

1. El antígeno Le^X induce la síntesis de mediadores inmunológicos, como la interleucina 10 (IL-10) y la prostaglandina E₂, que a su vez promueven las respuestas inmunitarias de tipo Th2 (Okano et al., 2001). Se sabe que Le^X se une a la lectina DC-SIGN, una lectina de tipo C (dependiente de Ca²⁺) implicada en la maduración de las células dendríticas (DC), la cual, junto con el “Toll-like receptor 4” (TLR-4) dirige la maduración de las DC hacia un fenotipo DC2 y por tanto hacia respuestas Th2 (Van Die et al., 2003).
2. El antígeno pseudo-Le^Y es expresado sólo en los glicolípidos de las cercarias. Este antígeno también actúa como ligando para la lectina DC-SIGN (como el Le^X) y, aunque aun no se ha demostrado, se supone que puede ser utilizado por el parásito para modular la respuesta anti-esquistosoma, previsiblemente induciendo tolerancia en las células dendríticas (Meyer et al., 2005).
3. El antígeno LacdiNAc (LDN) y sus derivados fucosilados (F-)LDN(-F) inducen respuestas similares al Le^X, aunque aun no se ha demostrado como (Jang-Lee et al., 2007).

3.4.2. *Glicanos antigénicos.*

1. Los grupos F-LDN(-F) y Le^X son también sintetizados por el hospedador, sin embargo son inmunogénicos e inducen una respuesta de anticuerpos durante el curso de la infección, aunque aun se desconoce el porqué (Hokke y Deelder, 2001). Los antígenos F-LDN(-F) son particularmente interesantes porque son los únicos antígenos glicánicos responsables de la reactividad cruzada entre los esquistosomas y la hemocianina de la lapa gigante californiana (Keyhole limpet haemocyanin, KLH) (Geyer et al., 2004), una proteína que debido a esta particularidad tiene valor como antígeno para el serodiagnóstico de la esquistosomosis (Robijn et al., 2005).

2. Por su parte, los elementos multifucosilados (DF-)LDN(-DF) difieren de los anteriores en que son sintetizados sólo por los esquistosomas y no por el hospedador. También en que sólo son expresados por los huevos y las cercarias, y no por el resto de las fases evolutivas (Hokke et al., 2007b). Estos elementos son particularmente abundantes en las secreciones de los huevos y, además, inducen fuertes respuestas humorales (Van Remoortere et al., 2003). Dado que el paso de los huevos desde el lecho vascular del hospedador hasta la luz del intestino requiere un sistema inmunitario intacto (Karanja et al., 1997) y dado que la respuesta inmunitaria frente a las secreciones de los huevos está dirigida casi exclusivamente frente a estos epítomos multifucosilados (Eberl et al., 2001), se ha sugerido que la función de dichos glicanos es facilitar el escape de los huevos hacia la luz intestinal, aunque los autores no proponen un mecanismo concreto (Jang-Lee et al., 2007).
3. Por último, los núcleos fucosa α 3, fucosa α 6 y xilosa β 2 son expresados por huevos y cercarias pero no por esquistosómulas ni adultos. Pues bien, estas estructuras también son expresadas por el hospedador intermediario pero no por el vertebrado, en el cual son altamente inmunogénicas. Estos cambios en su expresión a lo largo del ciclo biológico del parásito se supone que permiten a éste camuflarse o inducir señales inductoras de tolerancia en el hospedador correspondiente (Lehr et al., 2007; Van Die y Cummings, 2006).

3.5. Utilidad de los glicanos.

Los anteriores son solo unos pocos ejemplos que ilustran algunas de las funciones de los glicanos en la biología del parásito y en su relación con el hospedador. Dichas funciones -y las que previsiblemente se descubrirán en el futuro inmediato-, hacen que los glicanos de los esquistosomas (como entidades aisladas o como glicoconjugados) puedan ser de utilidad en el diagnóstico e inmunoprofilaxis de la esquistosomosis y potencialmente en el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias o auto-inmunes.

3.5.1. Valor diagnóstico.

Los glicanos de los esquistosomas se han utilizado ya en el diagnóstico de la esquistosomosis como marcadores de infección *per se* y como herramientas para la detección de anticuerpos anti-esquistosoma:

1. Como marcadores de infección. Las glicoproteínas CAA y CCA y ciertos glicoconjugados derivados de los huevos se han usado como marcadores diagnósticos en estudios epidemiológicos basados en la detección de dichos glicoconjugados en muestras de suero y orina utilizando anticuerpos monoclonales frente a ellos (Nash y Deelder, 1985; Nourel Din et al., 1994). Más recientemente, se han detectado, por espectrometría de masas, glicoconjugados excretados por los huevos de *S. mansoni* en muestras de orina, abriendo así nuevas posibilidades diagnósticas basadas en la detección directa y con alta sensibilidad de glicanos como marcadores de infección.
2. Como antígenos para la detección por serología de anticuerpos anti-glicanos. Los anticuerpos anti-glicanos son los mayoritarios en la respuesta anti-esquistosoma, en particular en la fase aguda de la infección (Eberl et al., 2001). Estos anticuerpos pueden detectarse utilizando como antígeno extractos crudos ricos en glicoproteínas, como es el extracto soluble de huevos, o glicoconjugados definidos de especies que tengan reactividad cruzada, como la hemocianina de la lapa gigante californiana (KLH), portadora de los grupos F-LDN-F (Geyer et al., 2005).

3.5.2. Valor vacunal.

Aunque en general, se admite que las respuestas anti-glicanos sirven para distraer al sistema inmune y así evitan producir respuestas anti-peptídicas, potencialmente más eficaces (Eberl et al., 2001), lo cierto es que ciertas respuestas humores anti-glicano confieren protección *in vivo* e *in vitro* (Nyame et al., 2003). De hecho (ver revisión de Seeberger y Werz, 2007), ya están comercializadas algunas vacunas eficaces frente a otros organismos infecciosos (como por ejemplo *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenza* tipo b) que están basadas en carbohidratos

(polisacáridos capsulares y neoglicoconjugados) y, de acuerdo con Nyame et al. (2004) podrían diseñarse vacunas similares frente a los esquistosomas y frente a otros helmintos en general, pues los glicanos de estos parásitos suelen presentar particularidades estructurales que los distinguen de los glicanos de sus hospedadores mamíferos.

3.5.3. Valor terapéutico.

Por sus actividades inmunomoduladoras algunos glicanos de los esquistosomas podrían tener utilidad en el tratamiento de enfermedades de base inmunológica. En concreto, los glicanos que están implicados en la orquestación de ambientes inmunológicos de tipo Th2 durante la fase crónica de la infección podrían ser de utilidad en el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos o enfermedades auto-inmunes. De hecho, ya se ha comprobado en modelos animales que la gravedad de algunas de estas enfermedades mejora tras la inducción de ambientes inmunológicos tipo Th2 mediante infecciones experimentales con helmintos. Tal es el caso de la diabetes tipo I (Zaccone et al., 2003), la colitis experimental (Smith et al., 2007) y la esclerosis múltiple (La Flamme et al., 2004).

4. INTERACCIÓN CON EL SISTEMA HEMOSTÁTICO DEL HOSPEDADOR.

Puesto que los esquistosomas adultos viven en los vasos sanguíneos del hospedador, además de con el sistema inmune, el parásito también está en contacto con los componentes de su sistema hemostático. No obstante, a pesar de la gran importancia que puede tener esta interacción en la biología del parásito, son muy pocos los estudios que han analizado este aspecto.

Uno de estos trabajos es el de DeMarco et al. (2003), en el que caracterizan una apirasa en la superficie de la cercaria, esquistosómula y adulto de *S. mansoni*. Esta enzima está implicada en la trombo-regulación al promover la hidrólisis de ADP e inhibir la agregación plaquetaria. Paralelamente, Stanley et al. (2003) demostraron que las plaquetas son un mecanismo innato de defensa frente a la infección por *S. mansoni* y que la trombocitopenia que se produce durante la infección puede ser una estrategia desarrollada por el parásito para evadir este mecanismo defensivo. En relación con estos hallazgos, Ruppel et al. (2002) sugieren que esta trombocitopenia podría explicar

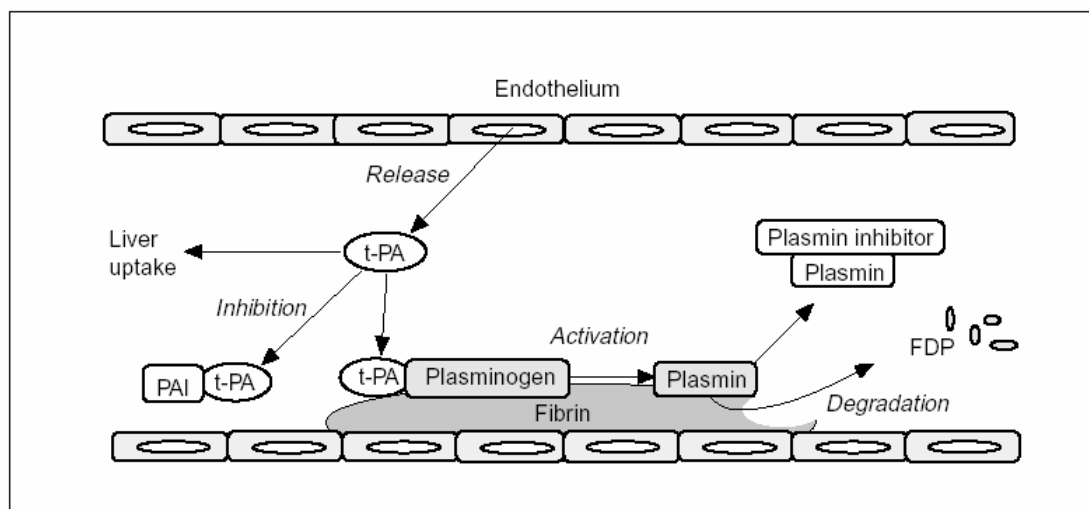
parcialmente el porqué no se forman coágulos de sangre alrededor de los vermes adultos.

Recientemente, se ha demostrado que un antígeno tegumental de *S. mansoni*, la proteína Sm22.6, inhibe a la trombina humana y actúa *in vitro* como anticoagulante retrasando el tiempo de coagulación hasta 3-4 veces (Lin & He, 2006).

Otro mecanismo que podría prevenir la formación de coágulos en la superficie de los vermes es la activación del sistema fibrinolítico. No obstante hasta la fecha no se ha llevado a cabo ningún estudio que analice la posible interacción de los esquistosomas con el plasminógeno.

El sistema fibrinolítico, en el cual el plasminógeno desempeña un papel central, tiene dos importantes funciones que son fundamentales en el mantenimiento de la hemostasia y en la migración celular. Estas funciones son la disolución de los coágulos de fibrina y la desintegración de la matriz extracelular.

El plasminógeno es una glicoproteína de cadena sencilla con una masa molecular de 92 kDa, que se produce principalmente en el hígado y está presente en la sangre y en otros fluidos extravasculares. El plasminógeno es una proenzima que tras su activación se convierte en plasmina, que es una serina proteasa. La diana principal de la plasmina es la fibrina y también determinados componentes de la matriz extracelular tales como laminina, fibronectina y vitronectina. Igualmente, se ha visto que esta enzima convierte algunos precursores de hormonas y citocinas en sus formas activas y parece ser que está también implicada en la metástasis del cáncer (Plow et al., 1995).



Cuadro 7. Esquema de la fisiología de la fibrinólisis.

En condiciones fisiológicas (Cuadro 7), la activación del plasminógeno y su conversión en plasmina están rigurosamente regulados. Los mamíferos tienen dos activadores de plasminógeno, el activador de plasminógeno tisular (t-PA) y la urokinasa (u-PA). El t-PA es el principal activador del plasminógeno en la sangre y el u-PA en la matriz extracelular.

Además de las funciones reguladoras de los activadores de plasminógeno (t-PA, u-PA), los inhibidores de la activación del plasminógeno (PAI) y los inhibidores directos de la plasmina, las superficies desempeñan funciones vitales en la regulación de la activación del plasminógeno. Nos referimos tanto a la superficie de la fibrina como a los receptores de la superficie celular.

La unión del plasminógeno se lleva a cabo a través de sus cinco dominios específicos denominados “dominios kringle”, los cuales tienen afinidad por los residuos de lisina. La mayor parte de las proteínas identificadas como receptores de plasminógeno tienen residuos de lisina en el extremo carboxiterminal (Plow et al., 1995), si bien también se han identificado otros motivos internos que intervienen en la activación del plasminógeno (Bergmann et al., 2003).

Los receptores de plasminógeno están presentes, además de en la red de fibrina, en diversos tipos de células, tales como monocitos, macrófagos, células endoteliales, células neuronales, fibroblastos, plaquetas y células cancerosas (Hawley et al., 2000). También se han identificado receptores de plasminógeno en la superficie de diversas bacterias, hongos, protozoos y helmintos.

La interacción con el sistema del plasminógeno de algunas bacterias y hongos, como *Streptococos* del grupo A, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi*, *Lactobacillus crispatus* y *Candida albicans*, ha sido extensamente estudiada. Diversos autores han comprobado que la activación del plasminógeno es una estrategia utilizada por estos patógenos para facilitar la infección en el hospedador y favorecer su diseminación por el organismo (Goguen et al., 2000; Lähteenmäki et al., 2001; Crowe et al., 2003; Hurmalainen et al., 2007). Los receptores de plasminógeno identificados hasta la fecha son proteínas de superficie, multifuncionales, entre las que se incluyen dos enzimas glucolíticas, la enolasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Las isoformas asociadas a la superficie de estas proteínas fijan el plasminógeno del hospedador y potencian su activación (Hurmalainen et al., 2007).

Del mismo modo, y al parecer con el mismo fin, los protozoos *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi* fijan y activan plasminógeno, siendo capaces, además, de potenciar la activación inducida por el t-PA (Avilan et al., 2000; Almeida et al., 2004; Mundodi et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que la enolasa de la superficie de los promastigotes de *L. mexicana* y de *T. vaginalis* es la molécula que actúa como receptor del plasminógeno (Vanegas et al., 2007; Mundodi et al., 2008).

En helmintos también se han identificado dos proteínas fijadoras de plasminógeno: la enolasa en *Fasciola hepatica* y *Onchocerca volvulus* y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en *O. volvulus*, si bien, hasta la fecha, no se ha estudiado el significado biológico de esta interacción (Jolodar et al., 2003; Bernal et al., 2004; Erttmann et al., 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL PARASITARIO

1. Parásitos.

Todos los estudios se han llevado a cabo utilizando la cepa autóctona de *Schistosoma bovis* de Salamanca. Esta cepa fue registrada en 1970 en el “Internacional Register of Living Helminths Species and Strains” de la OMS con el nombre de “*Schistosoma bovis*: Villar de la Yegua-Salamanca (Spain) strain” y se ha mantenido desde entonces en el IRNASA (CSIC) de Salamanca.

2. Hospedadores.

Los hospedadores empleados han sido ovinos, cricetos y caracoles acuáticos de la especie *Planorbarius metidjensis*.

Los ovinos han sido 24 corderos de raza castellana, y se han utilizado unos para el mantenimiento del ciclo biológico de *S. bovis* y otros para la obtención de los vermes adultos empleados en los experimentos. Estos animales, de 6 semanas de edad al comienzo de las pruebas, procedían de la explotación ovina experimental del IRNASA (Código ES370400000027) y se mantuvieron en las instalaciones de la propia explotación durante el tiempo que requirieron dichas pruebas.

Los cricetos se utilizaron con el fin de obtener huevos a partir de tejido hepático. El motivo de emplear estos animales es que en ellos la cantidad de huevos que se acumula por gramo de tejido hepático es bastante superior a lo que ocurre en ovinos. Se infectaron 20 cricetos dorados (*Mesocricetus auratus*), de 3 meses y 120 g de peso, que fueron mantenidos en el animalario del IRNASA con N° de Registro Oficial, P.A.E.-SA.002, con pienso concentrado, zanahorias y agua *ad libitum*.

Los caracoles se recogieron en el medio natural y se cultivaron en un acuario en el laboratorio alimentándolos con algas y berros.

3. Mantenimiento del ciclo biológico de *S. bovis* y obtención de vermes adultos.

El ciclo biológico de *S. bovis* se reprodujo en el laboratorio utilizando como hospedadores a los animales previamente indicados.

Los miracidios de *S. bovis* se obtuvieron a partir de huevos eliminados con las heces por corderos infectados experimentalmente. Las heces frescas se resuspendieron en agua y se filtraron por un tamiz de 350 μm de tamaño de poro para retirar el material más grueso. El filtrado se filtró de nuevo por un tamiz de 40 μm en el que, por su tamaño (200 μm x 50 μm), quedan retenidos los huevos de *S. bovis*. Los huevos se recogieron en placas de Petri con agua y, acto seguido, se indujo su eclosión mediante la exposición a una luz intensa durante 25 minutos, manteniendo la temperatura del agua entre 20 y 25°C. Los miracidios recién obtenidos se utilizaron inmediatamente para infectar caracoles.

Los caracoles se infectaron individualmente utilizando una placa de metacrilato de 80 pocillos. Para ello, cada caracol fue colocado en un pocillo distinto junto con 5 miracidios y 1 ml de agua y, acto seguido, la placa entera se colocó bajo una luz directa durante 3-4 horas.



Planorbarius metidjensis, acuario y placa multipocillo en la que se realizó la infección con miracidios.

Una vez infectados, los caracoles se trasladaron a pequeños acuarios de 5 litros en los que se mantuvieron a 28°C y en oscuridad durante 25-28 días, período a partir del cual comienzan a emitir cercarias cuando son expuestos a la luz. Para inducir la emisión de cercarias, los caracoles infectados se distribuyeron en lotes de unos 15 individuos, depositándolos en vasos de precipitado con 50 ml de agua y exponiéndolos a una luz intensa durante dos horas a temperatura ambiente (20-25°C). Las cercarias recién emitidas, normalmente unas 4.000-5.000 por lote, se diluyeron en agua hasta una concentración de 2.000 cercarias en 150 ml y se utilizaron inmediatamente para infectar nuevos corderos.

Los corderos se infectaron percutáneamente con 2.000 cercarias cada uno. Para ello se sumergió la extremidad anterior derecha del animal en 150 ml de la suspensión de cercarias durante 30 minutos. De todos los corderos se tomaron muestras de sangre antes de la infección, cada semana durante el primer mes y mensualmente hasta los 6 meses postinfección, momento en que los corderos fueron sacrificados para obtener vermes adultos. Los sueros resultantes de esas sangrías se preservaron a -80°C.

A los 6 meses de la infección, los corderos fueron sedados con 10 mg de ketamina por kg de peso y después sacrificados por desangrado tras seccionarles la vena yugular. Los vermes adultos se recogieron mediante disección de las venas mesentéricas, se depositaron en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 37°C y se lavaron cuidadosamente cambiando el medio varias veces. A continuación se examinaron microscópicamente para comprobar que estaban vivos e intactos y se procesaron inmediatamente para la obtención de los extractos proteicos objeto de estudio (ver a continuación) o para los análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal (ver más adelante).

Los cricetos se infectaron con 200 cercarias por vía percutánea mediante el procedimiento de baño individual durante 1 hora y se sacrificaron a las 16 semanas. Para la obtención de huevos se extrajeron los hígados y se procesaron tal y como se indica en el apartado I.5.

4. Preparación de extractos proteicos de vermes adultos de *S. bovis*.

Dado que el objeto de nuestro estudio son las moléculas parasitarias que el verme adulto expone al hospedador durante la infección, esto es, las excretadas-secretadas durante sus procesos vitales y las expresadas en la superficie de su tegumento, en consecuencia se han preparado dos extractos proteicos de adultos de *S. bovis*, uno con los productos de excreción-secreción (ES) y el otro a partir del tegumento (TG). Ambos extractos se prepararon siguiendo un protocolo similar al de Loukas et al. (2001), que detallamos a continuación.

Los vermes adultos recién obtenidos se lavaron dos veces en medio RPMI 1640 y a continuación se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en este mismo medio, suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Al cabo de 6 horas se recogió el medio de cultivo, que contiene los productos excretados-secretados por el parásito, y al cual denominamos extracto ES.

A continuación, para obtener el extracto de tegumento, los vermes se lavaron dos veces en tampón Tris salino (TBS) y se incubaron en Triton X-100 al 1% en TBS a 4°C, con agitación suave, durante 30 min. Al cabo de este tiempo se recuperó el medio de esta incubación, al que denominamos extracto TG.

Una vez separados de los vermes, a ambos extractos se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas siguiendo las indicaciones de Maizels et al. (1991). Dichos inhibidores y la concentración a la que se usaron fueron los siguientes:

Inhibidor	Concentración
EDTA	1 mM
N-Etilmaleimida	1 mM
Sulfofluoruro de metilfenilo (PMSF)	1 mM
Pepstatina A	0,1 µM
N-tosilamida-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK)	0,1 mM

A continuación, los dos extractos, ES y TG, fueron clarificados por centrifugación durante 30 min a 10.000 g y 4°C. Los sobrenadantes de esta centrifugación se dializaron frente a agua durante 24 horas y se concentraron mediante centrifugación al vacío hasta alcanzar concentraciones superiores a 3 µg/µl.

La concentración de las proteínas del extracto ES se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando el Protein Assay Kit I (Bio-Rad, ref. 500-0001), mientras que la concentración proteica del TG se determinó por el método de Lowry et al. (1951) utilizando el DC Protein Assay Kit I (Bio-Rad, ref. 500-0111). Los protocolos seguidos para estas determinaciones fueron los indicados por el fabricante en cada caso.

5. Preparación de extractos proteicos de cercarias y huevos de *S. bovis*.

Por motivos que se indicarán oportunamente también se prepararon extractos proteicos de cercarias y huevos de *S. bovis*. El procedimiento fue similar con ambas fases evolutivas y consistió en obtener un homogenado completo de cada una de esas fases evolutivas y en separarlo en dos fracciones (soluble e insoluble) por centrifugación a 100.000 g.

5.1. Preparación de extractos proteicos de cercarias.

Cercarias recién emitidas fueron suspendidas en PBS (unas 5.000 cercarias/ml) con inhibidores de proteasas a la concentración indicada por Maizels et al. (1991). La suspensión fue homogenizada por sonicación en hielo a 60 watios, 3 ciclos de 2 minutos, con pausas de 1 minuto. A continuación, el homogenado se centrifugó a 100.000 g, durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante (SB), o fracción soluble, se recogió y preservó a -80°C. El sedimento se lavó resuspendiéndolo en PBS y centrifugándolo como en el paso anterior. El nuevo sobrenadante se desechó y el sedimento lavado (SD), o fracción insoluble, se resuspendió en PBS con inhibidores de proteasas y se preservó a -80°C.

5.2. Preparación de extractos proteicos de huevos.

Los huevos se obtuvieron a partir de hígados de cricetos infectados y para ello se utilizó el método de digestión con tripsina descrito por Benex (1960), con algunas modificaciones.

El procedimiento consistió en la digestión del tejido hepático, previamente troceado, con tripsina durante 3 horas a 37°C. La tripsina se disolvió en un PBS modificado (ClNa 0,9%, ClK 0,02%, PO₄HNa₂ 0,11%, PO₄H₂K 0,02%, Cl₂Ca 0,01%) y se utilizó en una proporción de 7,5 mg por gramo de tejido. A continuación, el digerido se filtró por un tamiz de 350 µm para retirar los restos más gruesos y recoger la suspensión de los huevos. Esta suspensión se pasó por un tamiz de 40 µm donde quedan retenidos los huevos. Estos huevos se lavaron varias veces con NaCl al 1,2% y se recolectaron con una pipeta en la lupa binocular. A continuación se lavaron con PBS y, tras resuspenderlos finalmente en PBS con inhibidores de proteasas, se homogenizaron en un homogenizador de vidrio y se sonicaron en hielo a 60 vatios, 3 ciclos de 2 minutos, con pausas de 1 minuto. Como en el caso de las cercarias, el homogenado se centrifugó a 100.000 g, durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante (SB), o fracción soluble, se recogió y preservó a -80°C. El sedimento se lavó resuspendiéndolo en PBS y centrifugándolo como en el paso anterior. El nuevo sobrenadante se desechó y el sedimento lavado (SD), o fracción insoluble, se resuspendió en PBS con inhibidores de proteasas y se preservó a -80°C.

La concentración de las proteínas de los SB se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando el Protein Assay Kit I (Bio-Rad, ref. 500-0001), y la concentración proteica de los SD por el método de Lowry et al. (1951) utilizando el DC Protein Assay Kit I (Bio-Rad, ref. 500-0111).

II. ANÁLISIS DE LOS PROTEOMAS DE LOS EXTRACTOS ES Y TG.

Los proteomas de ambos extractos se analizaron utilizando técnicas de proteómica clásica. La separación de las proteínas se efectuó por electroforesis bidimensional, el análisis de los “spots” de interés por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y la identificación de las proteínas por comparación de sus huellas peptídicas y espectros de fragmentación con los depositados en las bases de datos.

1. Electroforesis bidimensional.

En su trabajo de grado, Ramajo-Hernández (2006) optimizó el protocolo para las electroforesis bidimensionales de los extractos ES y TG. Tras una serie de pruebas en las que se ensayaron diferentes condiciones, como los tampones y protocolos de solubilización de la muestra, los sistemas de carga de la muestra en las tiras de gradiente de pH inmovilizado (tiras IPG) y las condiciones eléctricas para el isoelectroenfoco, el protocolo finalmente establecido, y utilizado rutinariamente en el presente trabajo, fue el siguiente.

1.1. Solubilización y carga de las muestras en las tiras IPG.

Las muestras de los extractos ES y TG fueron solubilizadas en tampón Urea/Tiourea (tiourea 2M, urea 7M, CHAPS 4%, anfolitos del rango de pH correspondiente 0,2%, DTT 50 mM y azul de bromofenol 0,002%). Para ello, 25 ó 40 µg de proteína (ver más adelante) se incubaron en 125 µl de ese tampón, durante 60 minutos, a temperatura ambiente y con agitación suave. A continuación se clarificaron por centrifugación a 18.000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se recuperó y se cargó en las tiras IPG mediante el procedimiento de rehidratación pasiva en gel, durante 14-16 horas a 20°C. Este procedimiento se realiza colocando las tiras IPG, con el gel por la cara inferior, en los canales de la bandeja de rehidratación donde previamente se ha depositado la muestra de proteínas solubilizadas. Este sistema de

aplicación de muestras rehidrata las tiras IPG hasta su grosor original de 0,5 mm, al tiempo que permite la absorción de las proteínas en el interior del gel.

En ocasiones (ver apartado I.1.1. de resultados), con el fin de eliminar posibles contaminantes que pudieran interferir en el isoelectroenfoque y mejorar la resolución de determinadas proteínas del extracto ES, se practicaron algunas modificaciones en el protocolo anterior. Estas modificaciones consistieron en la purificación de las muestras antes de su solubilización y en la carga de las mismas mediante el procedimiento de “cup-loading”.

La purificación de las proteínas del extracto ES se llevó a cabo por dos métodos distintos:

- A. Utilizando el kit comercial ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, ref. 163-2130) y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- B. Por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y acetona aplicando el siguiente protocolo:
 - 1. Dilución de 100 µg del extracto ES en 1 ml de TCA al 10% en acetona con 0,07% de 2-mercaptoetanol. Incubación 1,5 horas a -20°C.
 - 2. Centrifugación a 18.000 g, 15 minutos, a 4°C y eliminación del sobrenadante.
 - 3. Lavado y resuspensión del sedimento con acetona fría. Incubación durante 3 horas a -20°C.
 - 4. Centrifugación a 18.000 g, 15 minutos, a 4°C y eliminación del sobrenadante.
 - 5. Secado del sedimento al aire y resuspensión en tampón de rehidratación Urea/Tiourea.

Las muestras así tratadas se cargaron en las tiras IPG utilizando el sistema “cup-loading”. Con este sistema la muestra de proteínas se aplica en un pocillo colocado sobre la tira previamente rehidratada durante 14-16 horas. En nuestro caso, el “cup-loading” se utilizó sólo con tiras IPG de pH 4,7-5,9 colocando el pocillo de carga próximo al cátodo.

1.2. Isoelectroenfoque.

El isoelectroenfoque (IEF), o primera dimensión, se llevó a cabo en el Protean IEF Cell (Bio-Rad), utilizando siempre tiras IPG de 7 cm de longitud (Bio-Rad) con diversos rangos de gradiente de pH (3-10, 5-8, 7-10 y 4,7-5,9).



Protean IEF cell de Bio-Rad.

Las tiras IPG se cargaron con 25 μ g de proteína en el caso de geles 2D destinados a ser teñidos con plata o con el colorante Sypro Ruby (ver más adelante). En el caso de geles destinados a hacer western blot 2D las tiras IPG se cargaron 40 μ g de proteína.

Una vez cargadas, las tiras IPG se colocaron en la bandeja de IEF con el gel por la cara inferior, en contacto con los electrodos. Entre el gel y cada electrodo se colocaron unos pequeños papeles de filtro humedecidos en agua para absorber el exceso de sales. Seguidamente las tiras se cubrieron con aceite mineral y se programaron diferentes condiciones eléctricas en función del rango de pH de las tiras IPG utilizadas (ver tabla a continuación), pero manteniendo siempre una temperatura de 20°C y una intensidad de corriente máxima de 50 μ A/tira.

Condiciones eléctricas en las que se llevó a cabo el isoelectroenfoque.

Tipo de tira IPG	Etapas del IEF	Voltaje inicial	Voltaje final	Tiempo	Voltios-hora totales acumulados
pH 3-10	1	0	250 V	15 min	
	2	250 V	4.000 V	2 horas	
	3	4.000 V	4.000 V		hasta 16.000 Vh
pH 5- 8	1	0	250 V	15 min	
	2	250 V	8.000 V	2 horas	
	3	8.000 V	8.000 V		hasta 20.000 Vh
pH 7-10	1	0	250 V	15 min	
	2	250 V	8.000 V	1 hora	
	3	8.000 V	8.000 V		hasta 20.000 Vh
pH 3-10	1	0	250 V	30 min	
	2	250 V	4.000 V	1 hora	
	3	4.000 V	4.000 V		hasta 10.000 Vh

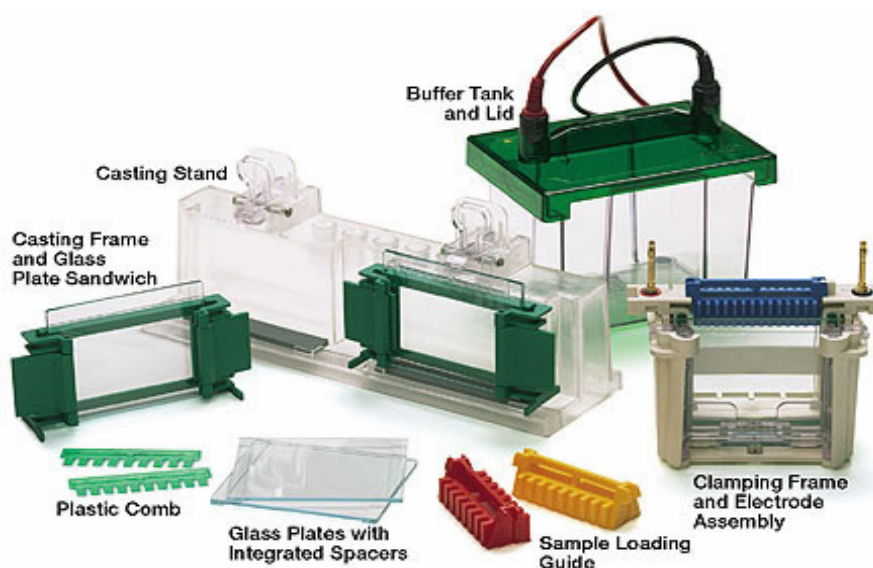
1.3. Equilibrado de las tiras.

Una vez completado el isoelectroenfoque, se procedió inmediatamente al equilibrado y reducción de las tiras IPG. Para ello las tiras se colocaron boca arriba en una bandeja de rehidratación y se incubaron a temperatura ambiente, con agitación suave, en 2,5 ml/tira de la solución correspondiente:

1. Durante 15 minutos en DTT 2%, urea 6M, Tris 0,05M pH 8,8, SDS 2% y glicerol 20%, para reducir los puentes disulfuro.
2. Decantado de la solución anterior e incubación durante 10 minutos en iodoacetamida 2,5%, urea 6 M, Tris 0,05 M pH 8,8, SDS 2% y glicerol 20%, para alquilar los grupos tiol y prevenir su reoxidación durante la electroforesis.

1.4. Segunda dimensión (SDS-PAGE)

La segunda dimensión se llevó a cabo rutinariamente en minigeles de 1 mm de espesor y diversas concentraciones de acrilamida (7,5%, 12% o en gradiente de 5-20%), utilizando el sistema Mini Protean cell (Bio-Rad).



Mini Protean cell de Bio-Rad.

Las tiras IPG se colocaron cuidadosamente en la parte superior de los minigeles en perfecto contacto con el gel y evitando la formación de burbujas. En un extremo se colocó un pequeño trozo de papel de filtro empapado con 3 μ l de un patrón preteñido de proteínas de amplio rango de peso molecular (7-200 kDa) (Bio-Rad, ref. 161-0318). Para evitar cualquier desplazamiento, la tira IPG y el papel se cubrieron con agarosa al 1% en tampón electrolito (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), a la cual se añadió una pequeña cantidad de azul de bromofenol para visualizar el frente de la electroforesis. Como norma general, la electroforesis se efectuó a 15 mA/gel durante los 15 primeros minutos y posteriormente a 30 mA/gel hasta el final.

Tras la electroforesis, los geles 2D fueron teñidos o bien transferidos a membranas de nitrocelulosa para su análisis por western blot.

2. Tinciones de los geles.

2.1. Tinciones de plata.

La mayoría de los geles 2D fueron teñidos rutinariamente con plata siguiendo un protocolo estándar (Stochaj et al., 2003). Esta tinción se eligió por su alta sensibilidad pero tiene el inconveniente de no ser compatible con el análisis por espectrometría de masas. Por este motivo, cuando los geles se utilizaron para cortar y analizar spots, el protocolo estándar se modificó a fin de hacerlo compatible con la espectrometría de masas, aunque esta modificación reduce ligeramente la sensibilidad de la tinción (Stochaj et al., loc. cit.).

En ambos protocolos todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave, empleando 50 ml/gel de cada una de las soluciones, las cuales se prepararon inmediatamente antes de usarlas.

El protocolo estándar fue el siguiente:

1. Fijación: etanol 40%, ácido acético 10%, 30 minutos.
2. Sensibilización: etanol 30%, glutaraldehído 0,125%, tiosulfato sódico 0,2%, acetato sódico 6,8 %, 30 minutos.
3. Lavados: 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua Milli Q.
4. Impregnado con Plata: nitrato de plata 0,25%, formaldehído 0,0148%, 20 minutos.
5. Lavados: 2 lavados de 1 minuto cada uno con agua Milli Q.
6. Revelado: carbonato sódico 2,5%, formaldehído 0,0074%, unos 5 minutos.
7. Parada de la reacción: EDTA 1,46%, 10 minutos.

El protocolo modificado fue similar al estándar pero con las siguientes diferencias: sin glutaraldehído en la solución sensibilizante (paso 2), sin formaldehído en la solución de nitrato de plata (paso 4) y con el doble de formaldehído (0,015%) en la solución de revelado (paso 6).

Los geles, una vez teñidos, se digitalizaron con el escaner ImageScanner (Amersham) y se conservaron en agua con 1% de ácido acético a 4°C o bien se secaron

en un secador de geles. En este último caso, para evitar la rotura durante el secado, los geles se sumergieron previamente, durante 30 minutos, en una solución acuosa de etanol 30% y glicerol 4%.

2.2. Tinción Sypro Ruby.

Los geles 2D empleados para el análisis cuantitativo de los spots se tiñeron con el colorante fluorescente Sypro Ruby (Bio-Rad, ref. 170-3126), el cual posee un amplio rango lineal de proporcionalidad entre la intensidad del spot y la cantidad de proteína presente en él, lo que permite cuantificar la abundancia relativa de dicha proteína en el conjunto del gel. Esta tinción proporciona una sensibilidad equivalente a la tinción de plata y es compatible con la espectrometría de masas.

Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave en 50 ml/gel de la solución correspondiente.

1. Fijación: 30 minutos, con metanol 10%, ácido acético 7%.
2. Tinción: al menos 3 horas, y en oscuridad, con la solución colorante Sypro Ruby.
3. Lavado: 30 minutos, con metanol 10%.

Estos geles, una vez teñidos, se digitalizaron con el sistema Fluor-S Maxmultimager (Bio-Rad) que captura imágenes fluorescentes.

3. Electrotransferencia y Western blot.

Las proteínas se transfirieron desde los geles 2D a membranas de nitrocelulosa según el método descrito por Towbin et al. (1979). La transferencia se realizó a 400 mA y 4°C durante 90 minutos en tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 7,2.

La detección de los spots antigénicos en las membranas de nitrocelulosa se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo.

1. Lavado de las membranas con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Postapizado con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C.
3. Lavados, 3 de 5 minutos con Tween-20 al 0,05% en PBS (PBST) a temperatura ambiente.
4. Incubación con sueros de cordero diluidos 1:50 en PBST con 0,5% de BSA, durante 1 hora a 37°C. Los sueros utilizados fueron una mezcla de sueros de corderos infectados con *S. bovis* tomados a los 6 meses postinfección (sueros positivos), y una mezcla de sueros de esos mismos corderos tomados antes de la infección (sueros negativos).
5. Lavados igual que en el paso 3.
6. Incubación con anti-IgG ovina marcada con peroxidasa (Sigma, ref. A-3415), diluida 1:2000 en PBST con 0,5% de BSA, durante 1 hora a 37°C.
7. Lavados como en el paso 3.
8. Revelado con luminol, utilizando el kit Immun-Star HRP Chemiluminiscent Kit (Bio-Rad, ref. 170-5041)
9. Digitalización de imagen quimioluminiscente con el sistema Fluor-S Max multimager (Bio-Rad).

4. Adquisición y análisis de las imágenes 2D.

Como ya se ha indicado, los geles 2D teñidos con plata se digitalizaron con el escaner ImageScanner (Amersham) y los teñidos con Sypro Ruby, así como los western blots quimioluminiscentes, con el sistema Fluor-S Max multimager (BioRad).

Las imágenes 2D resultantes fueron posteriormente analizadas con el programa ImageMaster 2D Platinum v5.0 (Amersham).

Con cada imagen se procedió, inicialmente, ajustando determinados parámetros para permitir al programa la detección automática de los spots. A continuación se depuró manualmente la detección automática añadiendo, borrando o modificando parcialmente los spots.

Hecho esto, se asignaron los valores de peso molecular a los spots de las proteínas patrón y los valores de pH de la tira IPG utilizada en cada caso a los extremos del gel/membrana. El programa determina automáticamente el peso molecular y el

punto isoeléctrico (pI) de cada spot, además de su área, intensidad y volumen (área x intensidad), entre otros parámetros.

La abundancia relativa de las proteínas en los spots se determinó sólo en los geles teñidos con Sypro Ruby. Para ello se determinó el porcentaje de volumen de cada spot respecto al volumen total de todos los spots del gel de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ volumen} = \text{volumen del spot} \times 100 / \text{suma de volúmenes de todos los spots del gel}$$

Para identificar a los spots antigénicos en los geles 2D teñidos con plata se emparejó automáticamente la imagen del western blot 2D con la del gel homólogo y se verificaron visualmente las concordancias establecidas por el programa.

5. Espectrometría de masas (MS) e identificación de proteínas.

Los spots que contenían las proteínas antigénicas y los 25 mayoritarios no antigénicos en cada extracto (ES y TG) se cortaron manualmente y se enviaron al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares de Madrid (CNIC) para la identificación por espectrometría de masas de las proteínas. A continuación se detallan las técnicas y equipos que se utilizaron en la Unidad de Proteómica del CNIC.

5.1. Digestión de las proteínas en gel y preparación de la muestra para el análisis mediante espectrometría de masas.

Los spots con las proteínas fueron digeridos de forma automática en un robot digestor Proteineer DP (Bruker-Daltonics). Se empleó el protocolo de digestión de Schevchenko et al. (1996) con ligeras variaciones: los fragmentos de gel fueron reducidos con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM y alquilados con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos se lavaron con

bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se añadieron 13 ng/ml de tripsina porcina modificada en bicarbonato amónico 50mM a los fragmentos y se dejó transcurrir la digestión durante 6 horas. Por último, se añadió ácido trifluoroacético al 0,5% para extraer péptidos.

Para la obtención de la huella peptídica y de los espectros de fragmentación se mezcló una alícuota del digerido arriba indicado con una alícuota de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo acuoso al 33% y 0,1% de ácido trifluoroacético. Dicha mezcla se depositó en un portamuestras MALDI AnchorChip de 600 mm² (Bruker-Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente.

5.2. Huella peptídica MALDI, espectros de fragmentación y búsqueda en bases de datos.

La huella peptídica y los espectros de fragmentación peptídica se obtuvieron en un espectrómetro de masas MALDI Bruker Ultraflex TOF/TOF (Bruker-Daltonics) (Suckau et al., 2003).

Los espectros de masas se midieron en modo reflector positivo empleando 140 ns de retardo en la extracción y láser de nitrógeno (337 nm). La frecuencia de repetición del láser fue 50 Hz y el voltaje de aceleración de los iones 25 kV. Las medidas se llevaron a cabo de forma automática mediante un programa basado en lógica difusa que acumuló 100 espectros o bien, acumulando 200 espectros manualmente.

Cada espectro fue calibrado internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina: [VATVSLPR+H]⁺ ($m/z = 842,510$) y [LGEHNIDVLEGNEQFINAAK+H]⁺ ($m/z = 2211,105$), obteniéndose una precisión típica para la medida de masa de ± 25 ppm. Se eliminaron de la lista de picos las señales conocidas provenientes de tripsina y queratinas, así como los potenciales aductos de sodio (+21,982 Da) u oxidaciones de metioninas (+15,995 Da).

Las masas de los péptidos tripticos así obtenidas fueron transferidas mediante el programa MS BioTools (Bruker-Daltonics) al motor de búsqueda Mascot (Matrix Science) para llevar a cabo la búsqueda en la base de datos NCBI nr.

El análisis en detalle de las huellas peptídicas de masa se realizó con el programa flexAnalysis (Bruker-Daltonics). Cuando fue necesario, los datos de MS/MS

procedentes de los espectros de fragmentación fueron combinados con los datos de MS de las huellas peptídicas para llevar a cabo las búsquedas en bases de datos con una tolerancia en la masa del ión parenteral de 20-40 ppm y un margen de error en la medida de la masa de los fragmentos iónicos de 0,25 - 0,50 Da.

III. ANÁLISIS DEL GLICOMA Y GLICOPROTEOMA DE LOS EXTRACTOS ES Y TG.

Este análisis tuvo como objetivos la caracterización de los glicanos presentes en la glicoproteínas de los extractos ES y TG y la identificación de dichas glicoproteínas. Los extractos ES y TG se analizaron con ocho lectinas de distinta especificidad, dos anticuerpos monoclonales anti-grupos Lewis (respectivamente, anti-Le^X y anti-Le^Y) y un anticuerpo policlonal anti-KLH (Keyhole limpet haemocyanin), que reconoce los motivos glicánicos F-LDN(-F) (Geyer et al., 2005). El análisis se efectuó por western blot e inmunoprecipitación, primero en una dimensión y después, con las lectinas/anticuerpos que dieron señal, se repitió en dos dimensiones. Los spots revelados por las distintas lectinas y anticuerpos se analizaron por espectrometría de masas.

Finalmente se verificó por ELISA la presencia de anticuerpos frente a los grupos Le^X, Le^Y y F-LDN(-F) en el suero de los corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

1. Electroforesis mono y bidimensionales.

Las electroforesis monodimensionales (SDS-PAGE) se llevaron a cabo en minigeles utilizando la cubeta Mini Protean cell (Bio-Rad). Se aplicó un sistema discontinuo de geles similar al descrito por Laemmli (1970). La concentración de acrilamida del gel de carga fue del 3% y la del gel separador del 12% y, en ocasiones, un gradiente del 5-20%. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras de ES y TG se hirvieron durante 5 minutos en tampón desnaturalizante (Tris-HCl 31,25 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerina 10 % y 2-mercaptoetanol 5%). Los geles se cargaron con 10 µg de proteína por pocillo y junto con las muestras se incluyó en cada gel, como referencia para la valoración de pesos moleculares, una mezcla de proteínas preteñidas (Bio-Rad, ref. 161-0318). Las electroforesis se realizaron a 30-45 mA/gel.

Las electroforesis bidimensionales se realizaron tal como se ha descrito previamente en el apartado II.1.

Una vez completadas las electroforesis, los geles fueron teñidos con nitrato de plata o bien transferidos a nitrocelulosa siguiendo los protocolos descritos en los apartados II.2 y II.3 de este mismo capítulo.

2. Blotting mono y bidimensional con lectinas

2.1. Blotting monodimensional (1D)

Las muestras de ES y TG previamente separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa se enfrentaron con 8 lectinas de distinta especificidad, que son las que se detallan en la tabla siguiente.

Lectinas empleadas en el análisis de los glicanos de los extractos ES y TG

Lectina	Fuente	Especificidad	Marcaje	Concentración de trabajo (µg/µl)
GNA	<i>Galantus nivalis</i>	Man α 1-3Man Man α 1-6Man Man α 1-2Man	Digoxigenina	1
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuNAc α 2-6Gal β		1
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	NeuNAc α 2-3Gal β		5
DSA	<i>Datura stramonium</i>	Gal β 1-4GlcNAc (LacNAc), GlcNAc-Ser/Thr		1
PNA	<i>Arachis hipogea</i>	Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr		10
WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc β 1-4GlcNAc (LDN)	Biotina	1
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc α 1-3GlcNAc		1
UEA-I	<i>Ulex europeus</i>	Fuc α 1-2Gal β		1

Dado que las lectinas estaban conjugadas con dos moléculas distintas, digoxigenina o biotina, fue preciso emplear protocolos distintos en cada caso.

2.1.1. Protocolo 1.

Las cinco lectinas marcadas con digoxigenina estaban incluidas en un kit comercial (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche) y se utilizaron siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante tras adaptar los volúmenes de los reactivos para membranas de 60 x 40 mm. Todas las incubaciones se hicieron a temperatura ambiente

y con agitación suave, excepto la incubación con la solución sustrato que se hizo sin agitación. El protocolo detallado fue el siguiente:

1. Lavado de las membranas con PBS durante 10 minutos.
2. Postapizado con 20 ml de solución de bloqueo, 30 minutos.
3. Lavados: 2 de 10 minutos con 20 ml de TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) más uno de 10 minutos con 20 ml de tampón 1 (TBS con MnCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM y MnCl_2 1 mM, pH 7,5).
4. Incubación con la lectina correspondiente diluida en 10 ml de tampón 1 (ver concentración de cada lectina en la tabla anterior), 1 hora.
5. Lavados: 3 de 10 minutos con 20 ml de TBS.
6. Incubación con 10 μl de anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina en 10 ml de TBS, 1 hora.
7. Lavados: como en el punto 5
8. Incubación con solución sustrato:
 - 10 ml de tampón 2 (Tris-HCl 100 mM, MgCl_2 50 mM, NaCl 100 mM, pH 9,5)
 - 50 μl de NTB (4-nitroblue tetrazolium chloride 7% en dimetilformamida 70%)
 - 37,5 μl de X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 5% en dimetilformamida)
9. Parada de la reacción con agua destilada.

2.1.2. Protocolo 2.

Las tres lectinas biotiniladas (WFA, LTA y UEA-I) fueron adquiridas por separado en Vector Laboratories (Peterborough, UK) y se utilizaron como sigue. Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente y cada lavado durante 10 minutos, también a temperatura ambiente.

1. Lavado de las membranas con 20 ml de PBS.
2. Postapizado con 20 ml de BSA al 3% en TBS.
3. Lavados: 3 veces, con 20 ml de Tween 20 al 0,3% en TBS.
4. Incubación con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la lectina correspondiente diluida en 10 ml de tampón de dilución (TBS con 0,05% de Tween-20 y 1% BSA).
5. Lavados: iguales que los anteriores.

6. Incubación con avidina-peroxidasa diluida 1:1000 (Sigma, ref. A-3151) en 10 ml del mismo tampón diluyente que las lectinas.
7. Lavados: igual que en pasos anteriores.
8. Revelado. Incubación con 20 ml de solución sustrato (PBS 80%, metanol 20%, 4-cloro-1-naftol 0,05% y H₂O₂ 0,02%).
9. Parada de la reacción con agua destilada.

2.2. Ensayos de inhibición de la unión de lectinas a las glicoproteínas

Sólo las lectinas GNA, WFA, LTA y UEA-I reconocieron glicoproteínas en uno o en ambos extractos (ver apartados II.1.1. y II.2.1. de resultados). Por este motivo y para comprobar la especificidad del reconocimiento se repitió el blotting 1D con dichas lectinas pero incluyendo, durante la incubación con la lectina, el monosacárido apropiado para bloquear la unión específica lectina-glicoproteína. Los monosacáridos utilizados se detallan en la siguiente tabla.

Monosacáridos utilizados en los ensayos de inhibición de la unión lectina-glicoproteína

Lectina	Monosacárido inhibidor	Concentración	Proveedor
GNA	α -metil-D-manósido	0,5 M	Sigma, ref. M-6882
WFA	N-acetil-D-galactosamina	0,2 M	Vector Laboratories, ref. S-9001
LTA	L-fucosa	3 M	Sigma, ref. F-2252
UEA-I	L-fucosa	1 M	Sigma, ref. F-2252

2.3. Blotting bidimensional e identificación de las glicoproteínas por espectrometría de masas.

Una vez comprobada la especificidad del reconocimiento de las glicoproteínas del parásito por parte de las cuatro lectinas, se procedió al análisis bidimensional de los extractos ES y TG con dichas lectinas.

Para ello, ambos extractos se resolvieron en geles 2D de rango de pH 5-8 y 7-10. Un lote completo de geles se tiñó con nitrato de plata, utilizando el protocolo compatible con espectrometría de masas (apartado II.2.1.), y otros geles equivalentes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en las condiciones habituales.

El extracto ES se analizó en 2D con GNA, WFA y LTA y el extracto TG se analizó en 2D con LTA y UEA-I. Los protocolos para estos análisis fueron iguales a los empleados en el análisis 1D, pero duplicando los volúmenes de los reactivos para adaptarlos a membranas más grandes (60 x 80 mm).

Los blots 2D resultantes y sus geles homólogos teñidos con plata se escanearon tal como se ha descrito previamente (apartado II.4.) y sus imágenes digitales se emparejaron para identificar en los geles a los spots reconocidos por las distintas lectinas. Dichos spots fueron cortados de los geles y analizados por espectrometría de masas (ver apartado II.5.) para la identificación de las glicoproteínas que contenían.

3. Western blot 1D

Las muestras de ES y TG previamente separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa fueron analizadas ahora con los anticuerpos monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y (Calbiochem, refs. 434631 y 434636) y con el policlonal anti-KLH (Sigma, ref. H-0892), en las siguientes condiciones.

1. Lavado de las membranas con 20 ml de PBS, 10 minutos, temperatura ambiente.
2. Postapizado con 20 ml de BSA al 2% en PBS, 1 hora, 37°C.
3. Lavados: 3 veces de 10 minutos, con 20 ml de PBS con Tween-20 al 0,05% a temperatura ambiente
4. Incubación con 2 µg/ml del anticuerpo primario (anti-Le^X, anti-Le^Y o anti-KLH) correspondiente, diluido en 10 ml tampón diluyente (PBS con Tween-20 al 0,05% y BSA al 1%), 1 hora, 37°C
5. Lavados: igual que en el paso 3.
6. Incubación con el respectivo anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, diluido en 10 ml de tampón diluyente, 1 hora, 37°C.
Goat anti-mouse IgM (Stressgen Bioreagents, ref. SAB-110), 1/1000
Goat anti-rabbit IgG (Sigma, ref. A-0545), 1/5000
7. Lavados: igual que en los pasos 3 y 5.

8. Revelado: con 4-Cl-1-naftol y/o con el kit Immun-Star HRP Chemiluminiscent Kit (Bio-Rad) y digitalización utilizando, respectivamente, el ImageScanner (Amersham) o el Fluor-S Multimager System (Bio-Rad).

4. Inmunoprecipitación (IP)

Las glicoproteínas del extracto TG que fueron reconocidas en los Western blots 1D por los anticuerpos monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y se purificaron a continuación por inmunoprecipitación (IP), utilizando los propios monoclonales como sondas específicas.

El protocolo utilizado para la IP fue una adaptación del descrito por Harlow y Lane (1988) y tuvo lugar en dos partes: primero se sensibilizaron microesferas de sepharosa 4B recubiertas de proteína G con uno u otro monoclonal y, a continuación, las microesferas sensibilizadas se incubaron con el TG para capturar y precipitar las glicoproteínas portadoras de grupos Le^X y/o Le^Y.

Finalmente, las glicoproteínas capturadas se separaron por electroforesis 2D y sus spots correspondientes se analizaron por espectrometría de masas para su identificación.

4.1. Sensibilización de las microesferas de sepharosa 4B recubiertas de proteína G con los monoclonales anti-grupos Lewis.

1. Incubación de 100 µg de proteína G-Sefarosa 4B (Sigma P-3296) con 10 µg de los anticuerpos monoclonales anti-Le^X o anti-Le^Y en 100 µl de PBS. Las reacciones se efectuaron en microtubos de ensayo de 1,5 ml a 4°C durante 12-16 h con agitación suave.
2. Centrifugación 2 minutos a 3.000 rpm y retirada de los sobrenadantes (material no unido).
3. Lavado de los sedimentos: 3 veces con 1 ml de PBS.
4. Resuspensión de los sedimentos en 100 µl de PBS.
5. La unión de los anticuerpos a la proteína G-Sefarosa 4B se comprobó analizando 10 µl de cada sobrenadante y sedimento en SDS-PAGE.

En paralelo se incubaron, en idénticas condiciones, 100 µg de extracto TG con 100 µg de proteína G-sefarosa 4B para comprobar que la proteína G no se une directamente a ningún componente del TG.

4.2. Inmunocaptura y precipitación de las glicoproteínas portadoras de grupos Lewis.

1. Incubación de la proteína G-sefarosa 4B sensibilizada con los monoclonales (unos 9 µg de monoclonal en cada sedimento) con 100 µg de extracto TG en un volumen total de 100 µl de PBS, 1 hora, 37°C, con agitación suave.
2. Centrifugación 2 minutos a 3.000 rpm y retirada de los sobrenadantes (material no unido).
3. Lavado de los sedimentos: 3 veces con 1 ml de PBS
4. Resuspensión de los sedimentos en 100 µl de PBS
5. El resultado de la inmunoprecipitación se comprobó analizando 20 µl de cada sobrenadante y sedimento en SDS-PAGE.

4.3. Electroforesis 2D y análisis por espectrometría de masas.

Los 80 µl restantes de cada sedimento se solubilizaron en tampón Urea/Tiourea y se resolvieron en 2 geles 2D de rangos de pH 5-8 y 7-10. Los geles se tiñeron con nitrato de plata y los spots correspondientes a las glicoproteínas capturadas se cortaron y analizaron por espectrometría de masas siguiendo los protocolos habituales (apartado II.5.).

5. ELISA para comprobar la ausencia de reactividad cruzada entre los monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y

Por los motivos que se indicarán en la discusión nos pareció necesario verificar que los monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y, que utilizamos en los western blot e inmunoprecipitaciones precedentes, no presentaban reactividad cruzada entre ellos.

Esta verificación se llevó a cabo por ELISA enfrentando cada monoclonal con las neoglicoproteínas LNFPIII-BSA y Le^Y-hexasacárido-BSA (ver obtención de neoglicoproteínas más adelante, en el apartado 6.1). El protocolo de dicho ELISA fue el siguiente.

1. Tapizado de la placa (Sigma, ref. M-4034) con 0,2 µg/pocillo de neoglicoproteína diluida en 100 µl/pocillo de tampón carbonato (CO₃Na₂ 15mM, CO₃HNa 34mM, pH 9,6), durante 2 horas a 37°C.
2. Lavados: 3 de 5 minutos, con 200 µl/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05% a temperatura ambiente.
3. Post-tapizado con 200 µl/pocillo de BSA al 5% en PBS, 2 horas a 37°C.
4. Lavados como en el paso 2.
5. Incubación con 100 µl/pocillo de monoclonal diluido 1/25 en tampón diluyente (PBS con Tween-20 al 0,3% y BSA al 1%), 1 hora a 37°C.
6. Lavado: como en los pasos anteriores.
7. Incubación con 100 µl/pocillo de Goat anti-mouse IgM-PO (Stressgen Bioreagents, ref. SAB-110) diluida 1/500 en tampón diluyente, 1 hora a 37°C.
8. Lavado: como en los pasos anteriores.
9. Revelado. Incubación con 100 µl/pocillo de solución sustrato.
 - 30 mg OPD (orto-fenil-diamina, Sigma P-1526)
 - 50 ml de tampón citrato pH 5 (ácido cítrico 25 mM + Na₂HPO₄·12H₂O 25mM)
 - 20 µl de H₂O₂ 33%
10. Parada de la reacción por adición de 100 µl/ pocillo de H₂SO₄ 3N
11. Lectura de la densidad óptica a 492 nm en un espectrofotómetro STL-Labinstruments, EAR 400 FT.

Como muestra la tabla a continuación, el resultado de este ELISA confirmó, como era de esperar, que cada monoclonal reconocía a su antígeno homólogo y no al heterólogo.

ELISA (DO media \pm desviación estándar de 6 pocillos). Reactividad de los monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y con las neoglicoproteínas LNFPIII-BSA y Le^Y-hexasacárido-BSA.

Neoglicoproteína	Control (sin monoclonal)	anti-Le ^X	anti-Le ^Y
LNFPIII-BSA	38 \pm 6	1164 \pm 41	41 \pm 4
Le ^Y -hexasacárido-BSA	27 \pm 5	34 \pm 11	454 \pm 16

6. ELISA con sueros de corderos infectados con *Schistosoma bovis*.

Los análisis por ELISA se llevaron a cabo para comprobar la presencia de anticuerpos, tanto de la clase IgM como IgG, frente a los grupos Le^X, Le^Y y F-LDN(-F) en el suero de los corderos infectados con *S. bovis*. Para ello, los sueros obtenidos de tres corderos a lo largo de los 6 meses de infección experimental se analizaron frente a los siguientes antígenos: los extractos ES y TG, la proteína KLH y las neoglicoproteínas Lacto-N-fucopentosa III (LNFPIII)-BSA (Le^X-BSA) y Le^Y-hexasacárido-BSA.

La proteína KLH se adquirió a Sigma (ref. H-7017) y la neoglicoproteína LNFPIII-BSA a Dextra Laboratorios (ref. NGP 0502). Por su parte, la neoglicoproteína Le^Y-hexasacárido-BSA fue sintetizada en el laboratorio a partir de BSA y de Le^Y-hexasacárido (Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, Dextra laboratorios, ref. LN423) mediante el método de amidación reductiva de Gray (1974) utilizando un protocolo similar al descrito por Nyame et al. (1996).

6.1. Síntesis de Le^Y-hexasacárido-BSA

1. Incubación de 200 μ g de Le^Y-hexasacárido con 67 μ g de BSA y 52 μ g de NaBH₃CN en 50 μ l de KH₂PO₄ 0,2 mM, pH 7,0, durante 15 días a temperatura ambiente para permitir la unión covalente del hexasacárido a la BSA.
2. Diálisis de la mezcla de reacción para eliminar sales y sacáridos no unidos. Se dializó utilizando las mini membranas Slide-A-Lyzer Mini Diálisis Units (Pierce Biotechnology, ref. 69558); se dializó en 1 litro de PBS durante 1 hora, se cambió el PBS y se dializó una hora más, todo ello a temperatura ambiente.

3. Análisis del resultado. La unión del hexasacárido a la BSA se verificó por western blot enfrentando la neoglicoproteína recién sintetizada y la BSA pura (1 μ g de cada) con el monoclonal anti-Le^Y.



Western blot: 1 μ g la neoglicoproteína Le^Y-hexasacárido-BSA y 1 μ g de BSA fueron enfrentadas con el monoclonal anti-Le^Y (1/50) y con anti-mouse IgM-PO (Stressgen Bioreagents, ref. SAB-110) 1/500. Revelado con 4-cloro-1-naftol.

6.2. Protocolo de ELISA.

Los sueros se analizaron siempre por duplicado a una dilución fija de 1/50 y el nivel de anticuerpos se valoró en función de la densidad óptica dada por los sueros a esa dilución.

1. Tapizado de las placas (Sigma, ref. M-4034) con el antígeno correspondiente diluido en 100 μ l de tampón carbonato (CO_3Na_2 15mM, CO_3HNa 34mM, pH 9,6), durante toda la noche a 4°C. La cantidad de antígeno por pocillo varió en función del propio antígeno: 0,5 μ g/pocillo de ES, TG y KLH y 0,2 μ g/pocillo de las neoglicoproteínas LNFPIII-BSA y Le^Y-BSA.

2. Lavados: 3 de 5 minutos, con 200 µl/pocillo de PBS con Tween-20 0,05% a temperatura ambiente.
3. Post-tapizado con 200 µl/pocillo de BSA 5% en PBS, 1 hora a 37°C.
4. Lavados: como en el paso 2.
5. Incubación con 100 µl/pocillo de suero diluido en tampón diluyente (PBS con Tween-20 0,3% y BSA 1%), 1 hora a 37°C.
6. Lavado: como en los pasos anteriores.
7. Incubación con 100 µl/pocillo de la anti-inmunoglobulina apropiada, marcada con peroxidasa, diluida en tampón diluyente, 1 hora a 37°C: anti-sheep IgG-PO (Sigma, ref. A-3415), 1/8.000 o anti-sheep IgM-PO (Bethyl Laboratorios, ref. 130-109P), 1/6.000
8. Lavado: como en los pasos anteriores.
9. Revelado. Incubación con 100 µl/pocillo de solución sustrato (OPD, orto-fenil-diamina).
10. Parada de la reacción por adición de 100 µl/ pocillo de H₂SO₄ 3N
11. Lectura de la densidad óptica a 492 nm en un espectrofotómetro STL-Labinstruments, EAR 400 FT.

IV. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL TEGUMENTO PARASITARIO Y EL PLASMINÓGENO DEL HOSPEDADOR.

Como se señaló en la introducción, es razonable pensar que los esquistosomas adultos puedan manipular el sistema hemostático de su hospedador para evitar, entre otros inconvenientes, la formación de coágulos en torno a ellos.

Al ser el plasminógeno una pieza clave del sistema fibrinolítico, esta parte del trabajo tuvo como objetivo averiguar si en el tegumento de los esquistosomas adultos existen proteínas ligadoras y activadoras de plasminógeno del hospedador y, en tal caso, identificar dichas proteínas.

Con ese fin se han hecho las siguientes pruebas: (i), comprobar por ELISA y blotting que el extracto TG une plasminógeno; (ii), comprobar que, además de unirse al plasminógeno, el extracto TG lo activa induciendo la formación de plasmina; (iii), comprobar por microscopía confocal que el plasminógeno se fija a la superficie del tegumento en vermes enteros y (iv), identificar por espectrometría de masas a un grupo de proteínas tegumentales que unen plasminógeno.

1. Unión del plasminógeno a proteínas del TG

1.1. ELISA

Se efectuó de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Tapizado de las placas con 1 µg / pocillo de TG en 100 µl de tampón carbonato pH 9,6, durante 14-16 horas a 4°C.
2. Lavados: 3 de 5 minutos, con 200 µl/pocillo de PBS con Tween-20 0,05% a temperatura ambiente.
3. Post-tapizado con BSA 1% en PBS, 1 hora a 37°C.
4. Lavados: como en el paso 2

5. Incubación con cantidades crecientes (desde 0 a 3 µg/pocillo) de plasminógeno humano (Acris Antibodies, ref. BA522) diluido en 100 µl de PBS con 1% de BSA, 1 hora, 37°C.
6. Lavados: igual que en los pasos anteriores.
7. Incubación con 0,1 µg/pocillo de un anticuerpo anti-plasminógeno conjugado con peroxidasa (Cedarlane Laboratorios, ref. CL20085APHP) diluido en 100 µl PBS, 1 hora a 37°C.
8. Lavados: como en pasos anteriores.
9. Revelado. Incubación con 100 µl/pocillo de solución sustrato (OPD, orto-fenil-diamina).
10. Parada de la reacción por adición de 100 µl/ pocillo de H₂SO₄ 3N
11. Lectura de la densidad óptica a 492 nm en un espectrofotómetro STL-Labinstruments, EAR 400 FT.

En paralelo se realizaron análisis idénticos al anterior pero incluyendo en el paso de incubación con plasminógeno ácido ε-aminocaproico (εACA) 40 mM (Sigma, ref. A-2504), un análogo de lisina que inhibe competitivamente la unión del plasminógeno a su receptor.

En todas las placas se incluyó, a modo de control negativo, una serie de pocillos carentes de extracto TG, tapizados sólo con BSA.

1.2. Blotting 1D con plasminógeno.

Las proteínas del extracto TG se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en las condiciones habituales (apartado II.3.). A continuación se cortaron tiras de nitrocelulosa de 4 mm de ancho y se procesaron siguiendo el protocolo de Crowe et al. (2003).

1. Lavado de las tiras: 3 veces de 10 minutos, con TBS a temperatura ambiente.
2. Postapizado con BSA 3% en TBS durante 1 hora a 37°C.
3. Lavados con Tween-20 0,05% en TBS, 4 veces de 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Incubación con 35 µg/ml de plasminógeno humano (Acris Laboratorios, ref. BA522) en tampón diluyente (TBS con EDTA 25mM, Tween-20 0,05% y BSA 1%), 14-16 horas a 4°C.
5. Lavados, igual que en el paso 3.
6. Incubación con 0,5 µg/tira del anticuerpo anti-plasminógeno diluido en tampón diluyente, 1 hora a 37°C.
7. Lavados: como en los pasos anteriores.
8. Revelado con 4-cloro-naftol (PBS 80%, metanol 20%, 4-Cl-1-naftol 0,05% y H₂O₂ 0,02%).

Con el fin de valorar posibles uniones inespecíficas también se incluyeron tiras controles que no contenían TG o que no se incubaron con el plasminógeno.

2. Ensayos de activación del plasminógeno.

Para comprobar si el extracto TG activa el plasminógeno y genera plasmina, se efectuó un ensayo en el que se midió la actividad amidolítica de la plasmina generada sobre un substrato cromogénico, en concreto el S2251 (Sigma, ref. V0882). El protocolo de este ensayo se adaptó a partir del descrito por Almeida et al. (2004).

El ensayo se hizo en placas de ELISA incubando a temperatura ambiente en un volumen de 100 µl de PBS los reactivos siguientes:

- 5 µg de plasminógeno
- 0,6 mM de substrato cromogénico S2251
- cantidades crecientes del extracto TG: de 0 a 12 µg/pocillo
- 10 nM de t-PA

El t-PA (Sigma, ref. T4825-1VL), un activador fisiológico del plasminógeno, se añadió en último lugar para iniciar la reacción de activación del plasminógeno. En un ensayo paralelo se midió la generación de plasmina en ausencia del activador t-PA.

La generación de plasmina y la subsiguiente hidrólisis del substrato cromogénico S2251 se monitorizó midiendo la absorbancia a 405 nm cada 10 minutos durante las dos horas siguientes.

3. Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la unión del plasminógeno a la superficie de los vermes adultos de *S. bovis*.

Estos ensayos se llevaron a cabo con vermes adultos intactos recién obtenidos y cuidadosamente lavados en PBS (ver apartado I.3.) y también con vermes intactos y fijados durante 24 horas con formol al 10% en PBS.

Ambos tipos de vermes se procesaron igual, siguiendo un protocolo equivalente al descrito por Nyame et al. (2003).

1. Incubación de los vermes (10 parejas/tubo) con 10 µg de plasminógeno humano diluido en 1 ml de PBS con BSA al 1%. La incubación se realizó en tubos de 1,5 ml durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave.
2. Lavados: 4 veces, con 1 ml de PBS.
3. Incubación con 10 µg de anticuerpo anti-plasminógeno marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Acris antibodies, ref. BP749F) diluido en 1 ml de PBS. La incubación se efectuó durante 14-16 horas, con agitación suave, a 4°C y en oscuridad.
4. Lavados: como en el paso 2.
5. Análisis de los vermes con el microscopio confocal Leica TCS-NT, usando un láser de Argón 488 nm y un filtro de 515 nm. Los esquistosomas se observaron con el objetivo de 10x (Plan Floutar 0.3 NA) en secciones de 5 µm.

En paralelo se realizaron ensayos de inhibición competitiva de la unión de plasminógeno incluyendo εACA 40 mM en la incubación de los vermes con el plasminógeno.

También, para descartar posibles uniones no específicas, se incluyeron varios lotes de vermes control, en los que se omitió la incubación con el plasminógeno, el anticuerpo anti-plasminógeno o con ambos.

4. Blotting 2D con plasminógeno e identificación por espectrometría de masas de las proteínas ligadoras de plasminógeno.

Las proteínas del extracto TG se resolvieron en geles 2D de rangos de pH 5-8 y 7-10. Parte de los geles se tiñeron con nitrato de plata utilizando el protocolo compatible con espectrometría de masas (apartado II.2.1.) y el resto se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

A continuación, las membranas 2D se procesaron siguiendo el mismo protocolo que con las tiras del blotting 1D (apartado III. 1. 2), pero adaptando el volumen de los reactivos al tamaño de las membranas enteras y revelando con luminol en lugar de 4-Cl-1-naftol.

Los blots 2D resultantes y sus geles homólogos teñidos con plata se digitalizaron tal como se ha descrito previamente (apartado II.4.) y sus imágenes digitales se emparejaron para identificar en los geles a los spots que fijaron plasminógeno.

Dichos spots fueron cortados de los geles y analizados por espectrometría de masas (ver apartado II.5.) para la identificación de las proteínas implicadas.

RESULTADOS

I. PROTEOMA DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN Y DEL EXTRACTO DE TEGUMENTO.

1. Análisis proteómico de los productos de excreción-secreción (ES).

1.1. Electroforesis bidimensional del extracto ES.

Con el fin de obtener una imagen lo más completa posible de los componentes del extracto ES, dicho extracto se separó inicialmente en geles 2D con amplios rangos de pH (3-10) y concentración de acrilamida (en gradiente lineal 5-20%). Tras ser teñidos con plata, estos geles mostraron unos 350 spots, aunque escasamente resueltos, con pIs entre 5 y 9 y amplio rango de pesos moleculares (PM) (15-200 kDa). Únicamente se observan 2 spots con $pI < 5$ (Fig. 1).

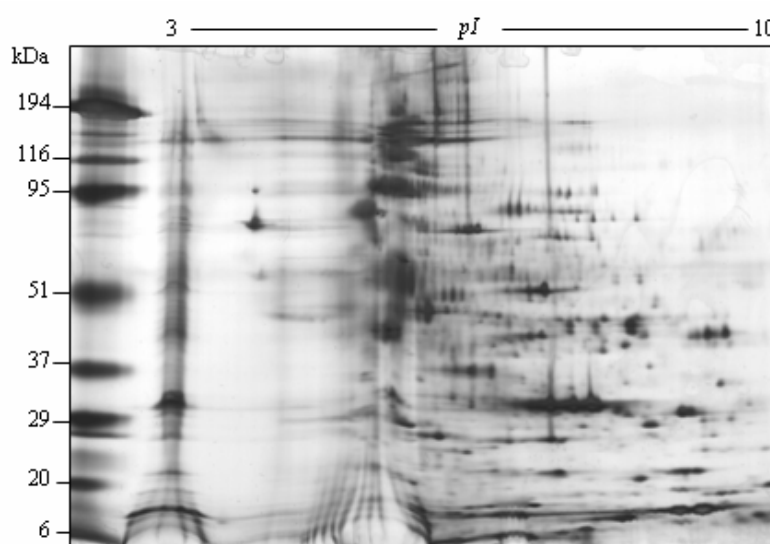


Figura 1. Electroforesis 2D de 25 µg de extracto ES. Gel de pH 3-10 y 5-20% de acrilamida teñido con plata.

Una vez conocidos los rangos de pI y PM de las proteínas del extracto ES, y con el fin de conseguir una mejor separación entre spots, este extracto se separó a continuación en geles 2D de dos rangos de pH (5-8 y 7-10) y 12% de acrilamida en lugar del gradiente 5-20%. Como se observa en la Fig. 2, utilizando estas condiciones se consiguió una mejor separación de los componentes del ES. La tinción de plata reveló unos 400 spots, la mayoría de ellos con pIs entre 5 y 8. Sólo 19 spots mostraron pIs fuera de ese rango, en concreto, entre 8 y 9.

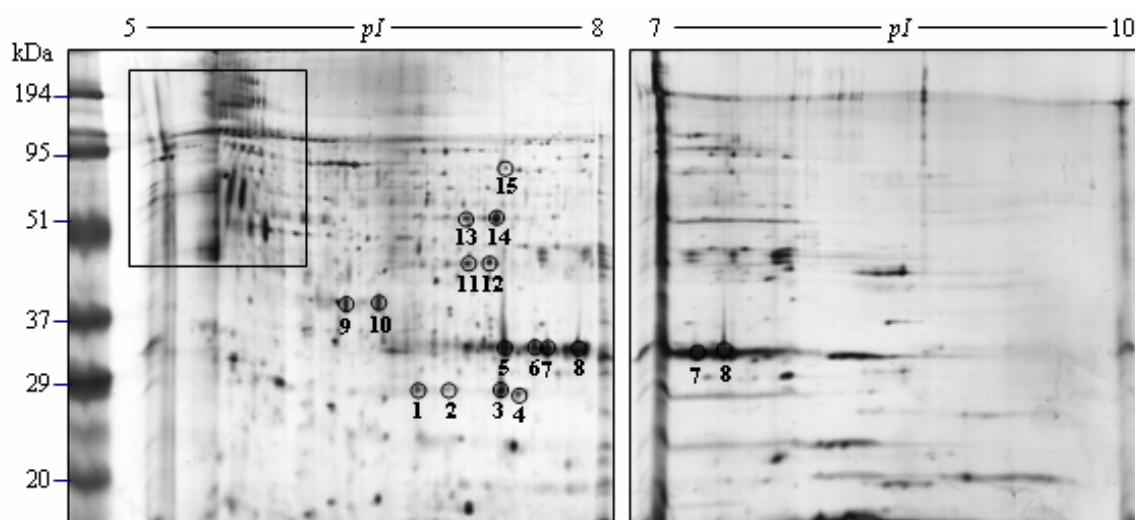


Figura 2. Electroforesis 2D de 25 µg de extracto ES. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida teñidos con plata. Los números indican los spots que contenían proteínas antigénicas y que se analizaron por espectrometría de masas.

La Fig. 2 también muestra un grupo de proteínas con pIs entre 5,3 y 5,8 y PMs entre 50 y 200 kDa que no se resuelven bien (encuadrado en la Fig. 2). Estas proteínas son muy abundantes en el extracto ES y además, como se verá más adelante, son muy antigénicas, por lo que nos propusimos mejorar su resolución. Para ello el ES se separó en geles 2D de pH 4,7-5,9 y 7,5% de acrilamida. La Fig. 3 muestra que en estos geles los spots se separaron mejor, pero, aun así, no se obtuvo un mapa de spots claramente definidos.

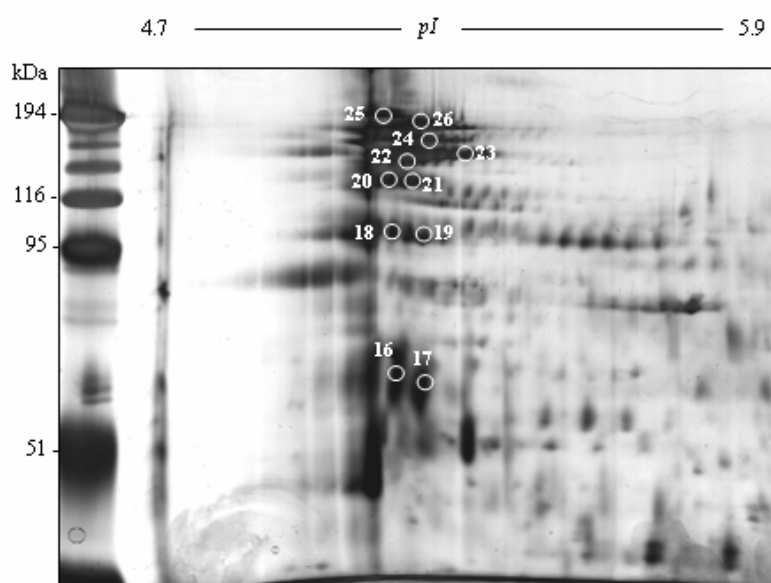


Figura 3. Electroforesis 2D de 40 µg de extracto ES. Gel de pH 4,7-5,9 y 7,5% acrilamida teñido con plata. Los números indican los spots que contenían proteínas antigénicas y que se analizaron por espectrometría de masas.

De acuerdo con lo habitualmente señalado en la bibliografía, la persistente baja resolución en esta zona podría deberse a la presencia en el extracto ES de contaminantes ácidos que interfirieran con el isoelectroenfoque. Para tratar de eliminar los supuestos contaminantes, las proteínas del ES se purificaron antes del isoelectroenfoque utilizando dos métodos: la precipitación con TCA/acetona y el kit Clean-up de Bio-Rad. Las muestras purificadas se cargaron en las tiras IPG mediante el sistema “cup-loading”, puesto que según lo descrito, este sistema mejora la resolución y el enfoque de las proteínas con pIs extremos, y se realizaron geles 2D idénticos a los anteriores (pH 4,7-5,9 y 7,5% acrilamida).

Estas modificaciones (la purificación previa y el sistema de carga “cup-loading”) no modificaron en absoluto la resolución ni el número de spots en los geles. No se muestran imágenes de estos nuevos geles por ser idénticos al de la Fig. 3.

1.2. Proteínas antigénicas en el extracto ES

Para detectar las proteínas antigénicas del extracto ES se realizaron western blot 2D a partir de geles 2D de rangos de pH 5-8 y 7-10.

Como se observa en la Fig. 4, la mezcla de sueros de corderos infectados (positivos) reconoció en estos inmunoblots un total de 17 spots bien definidos y un grupo de spots muy reactivos pero poco separados entre sí. Este grupo de spots tienen unos pIs entre 5,3 y 5,5 y unos PMs entre 90 y 200 kDa. No se reveló ningún spot antigénico con pI superior a 8.

La mezcla de sueros negativos no reveló ningún spot en unos western blot 2D equivalentes a los anteriores (imágenes no mostradas).

Estos resultados indican que sólo el 6-7% de los spots en los que se resuelve el extracto ES contienen proteínas antigénicas.

El análisis con el programa ImageMaster de las imágenes de los western 2D y de los geles 2D homólogos teñidos con plata nos permitió localizar en los geles 2D a los spots que contenían las proteínas antigénicas.

Estos spots (26 en total) se seleccionaron y cortaron para su análisis por espectrometría de masas: 15 spots se cortaron de geles 2D de pH 5-8 (Fig. 2) y los 11 restantes de geles 2D de pH 4,7-5,9 (Fig. 3).

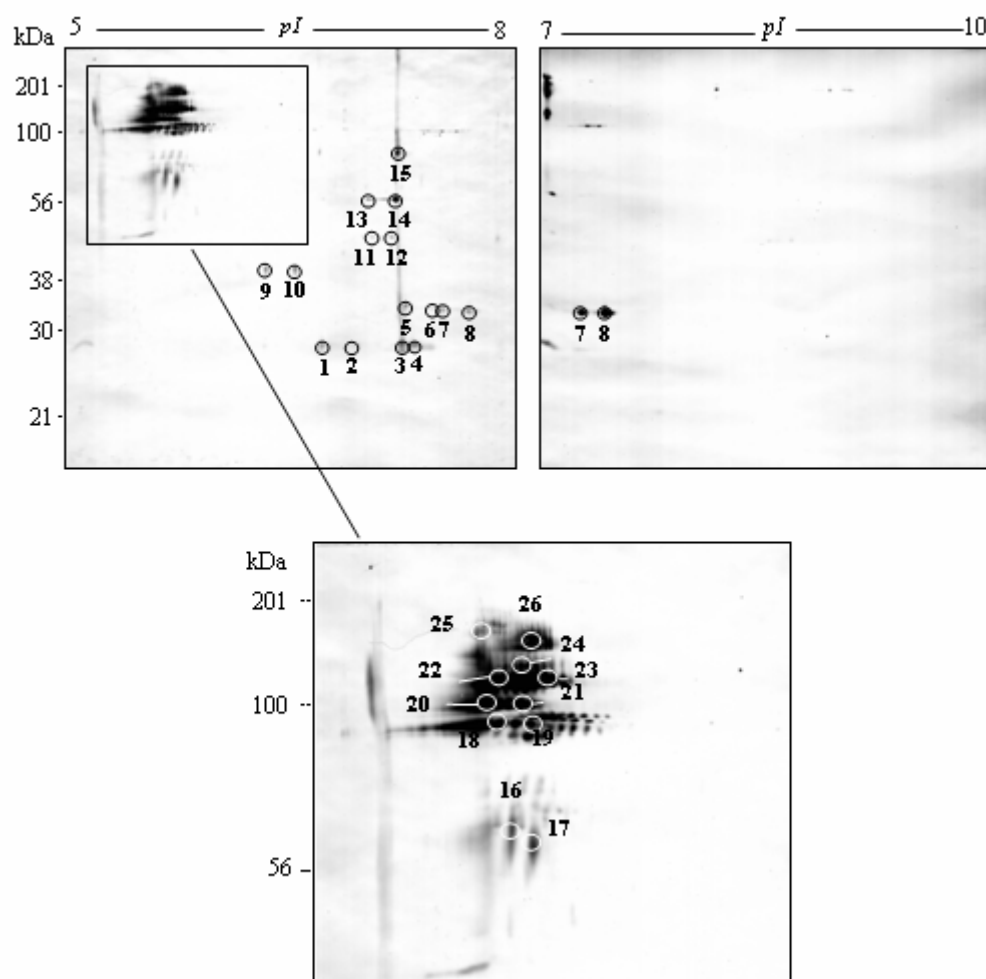


Figura 4. Western Blots 2D de pH 5-8 y 7-10 y 12% acrilamida del extracto ES. Spots revelados por una mezcla de sueros de corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*. Los números indican los spots antigénicos que se analizaron por espectrometría de masas para su identificación (ver geles homólogos en Figs 2 y 3).

En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis por espectrometría de masas de cada uno de los spots. De los 26 spots analizados 21 fueron identificados mediante la comparación de su huella peptídica (PMF) y/o de su espectro de fragmentación de péptidos (MS/MS) con los depositados en las bases de datos.

Los 21 spots identificados corresponden a 6 proteínas diferentes: proteína de superficie del verme (Surface protein fluke, SPF), inhibidor de serina proteasa (serpina), enolasa, catepsina B endopeptidasa (CBendo), 28 kDa glutatión S-transferasa (Sb28GST) y antígeno de tegumento (SMA 22.6).

De cada proteína se identificaron entre 2 y 8 isoformas, las cuales mostraron diferentes pIs pero prácticamente el mismo peso molecular. La única excepción fueron

las isoformas de la proteína de superficie del verme que presentan la situación inversa, es decir son isoformas con pIs similares y PMs bastante diferentes (100-194 kDa).

Todas estas proteínas, salvo la Sb28GST, se identificaron por su similitud con proteínas homólogas de otras especies del género *Schistosoma* (*S. mansoni* y *S. haematobium*). La Sb28GST es una de las pocas proteínas de *S. bovis* cuya secuencia está depositada en las bases de datos.

Tabla 1. Identificación de las proteínas antigénicas del extracto ES mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las base de datos NCBI.

Spot	Proteína	Especie	Nº acceso (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
1	SMA22.6 ^a	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/6.7	14	85
2	SMA22.6 ^a	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/6.9	14	85
3	SMA22.6 ^a	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/7.2	14	93
5	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.2	42	158
6	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.4	35	135
7	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.5	30	127
8	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.7	29	110
9	CBendo	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.3	21	87
10	CBendo	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.5	19	85
13	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/7.0	10	111
14	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/7.2	17	113
16	Serpina ^b	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/62	4.9/5.1	-	49
17	Serpina ^a	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/62	4.9/5.2	19	88
18	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/102	4.7/5.1	6	86
20	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/130	4.7/5.1	6	90
21	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/130	4.7/5.1	7	101
22	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/156	4.7/5.1	6	83
23	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/160	4.7/5.2	5	83
24	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/173	4.7/5.1	6	90
25	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/194	4.7/5.2	5	84
26	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/191	4.7/5.1	6	94

SMA22.6, antígeno de tegumento; Sb28GST, glutatión S-transferasa de 28 kDa; CBendo, catepsina B endopeptidasa; SPF, proteína de superficie del verme.

^a Spots identificados utilizando datos PMF en combinación con datos MS/MS.

^b Spots identificados con los datos del espectro de MS/MS

1.3. Análisis cuantitativo del extracto ES e identificación de las proteínas mayoritarias no antigénicas.

El análisis 2D de las proteínas del extracto ES muestra que la mayor parte de las proteínas que componen dicho extracto tienen pIs entre 5 y 8. Por este motivo únicamente realizamos el análisis cuantitativo en geles de este rango de pH. Estos geles fueron teñidos con el colorante fluorescente Sypro Ruby, que permite determinar la abundancia relativa de las proteínas en el extracto ES (Fig. 5).

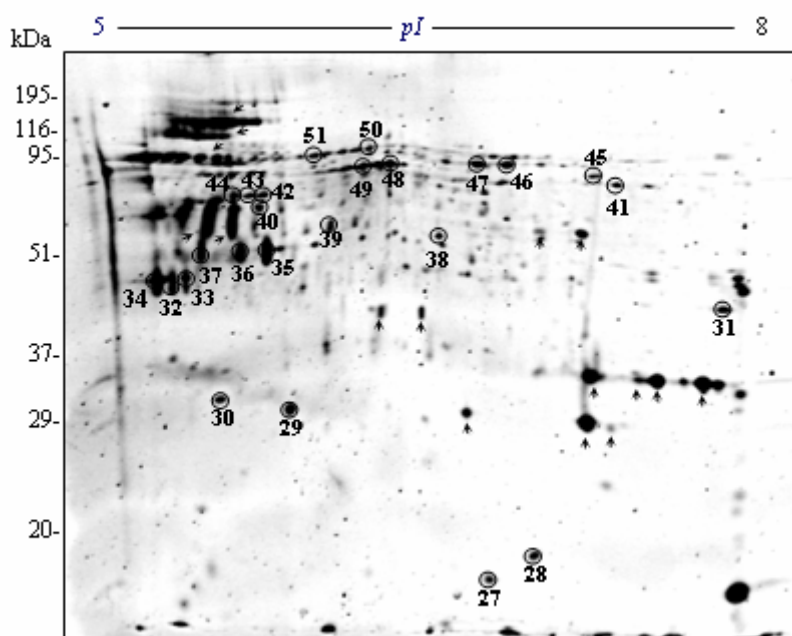


Figura 5. Electroforesis 2D de 25 µg de extracto ES. Gel de pH 5-8 y 12% acrilamida teñido con Sypro Ruby. Los números indican los 25 spots no antigénicos más abundantes y las flechas los spots antigénicos identificados previamente.

El análisis de dichos geles con el programa ImageMaster mostró que los componentes mayoritarios del ES son 4 de las 6 proteínas antigénicas identificadas previamente: SPF, Sb28GST, serpina y SMA 22.6.

Tras el análisis de las imágenes de los geles 2D teñidos con Sypro Ruby se seleccionaron los 25 spots no antigénicos más abundantes y se analizaron por espectrometría de masas para su identificación.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de este análisis. De los 25 spots analizados, se identificaron 9 que corresponden a 6 proteínas parasitarias y 1 del

hospedador: proteína unidora de ácidos grasos (FABP), superóxido dismutasa (SOD), proteína de superficie (SPF), tioredoxina glutatión reductasa (TGR), una proteína similar a la anexina A13, una lisozima y la pre-pro albúmina sérica ovina (Pre-prOSA).

Destaca el hecho de que los spots no antigénicos nº 34 y 35 fueron identificados como SPF, una proteína que, como acabamos de ver, es antigénica y mayoritaria en el extracto ES. No obstante, estos dos spots mostraron pesos moleculares (47 y 53 kDa, Tabla 2) muy inferiores a los de los spots antigénicos identificados en el apartado anterior como SPF (102-194 kDa, Tabla 1).

Los datos del espectro MS/MS sirvieron para identificar al spot nº 31 como una proteína desconocida de *S. japonicum* (AAW24721) que, de hecho, es similar a la anexina A13 de *Mus musculus* (GenBank AAP06415). El spot nº 38 fue identificado como lisozima, pero debido a la ausencia de información sobre lisozimas de esquistosomas, y dada la similitud que muestran las secuencias de lisozima de otros invertebrados, no fue posible establecer con fiabilidad la homología del spot nº 38 con una lisozima en particular de las registradas en las bases de datos.

Tabla 2. Identificación de las proteínas mayoritarias no antigénicas del extracto ES mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos NCBI.

Spot	Proteína	Especie	Nº de acceso. (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
27	FABP	<i>S. bovis</i>	AAT39384	15/16	7.8/6.7	61	160
28	SOD (Cu-Zn) ^a	<i>S. mansoni</i>	Q01137	16/19	6.6/6.8	30	133
31	Similar a anexina ^b	<i>S. japonicum</i>	AAW24721	40/43	7.7/7.6	-	73
34	SPF ^b	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/47	4.7/5.2	-	54
35	SPF ^a	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/53	4.7/5.7	6	85
38	Lisozima	-----	-----	-/59	-/6.4	33	88
41	TGR	<i>S. mansoni</i>	AAK85233	66/80	6.4/7.2	9	80
48	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/92	5.8/6.2	19	120
49	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.0	13	84

FABP, proteína unidora de ácidos grasos; SOD, superóxido dismutasa; SPF, proteína de superficie del verme; TGR, tioredoxina glutatión reductasa; Pre-prOSA, pre-pro albúmina sérica ovina.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF y los datos MS/MS.

^b Spots identificados con datos MS/MS únicamente.

2. Análisis proteómico del extracto de tegumento (TG)

2.1. Electroforesis bidimensional del extracto TG

Como en el caso del extracto ES, las proteínas del extracto TG se separaron inicialmente en geles 2D con amplio rango de pH (3-10) y de concentración de acrilamida (5-20%). Como se observa en la Fig. 6, la tinción con nitrato de plata reveló en estos geles aproximadamente 300 spots, escasamente resueltos, con unos pIs entre 5 y 10 y un amplio rango de PMs.

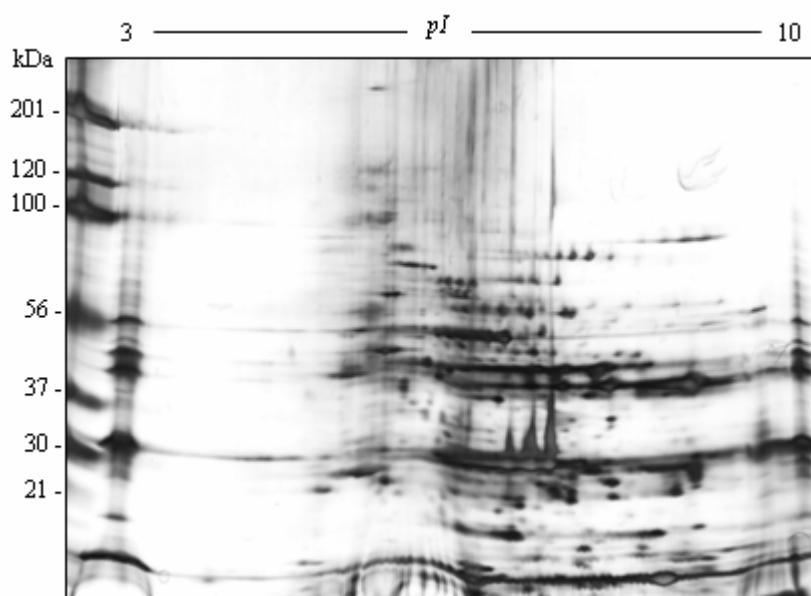


Figura 6. Electroforesis 2D de 25 µg de extracto TG. Gel de pH 3-10 y 5-20% acrilamida teñido con plata.

Conocidos los rangos de pI y PM de los componentes del TG, se elaboraron nuevos geles 2D de dos rangos de pH (5-8 y 7-10) y 12% de acrilamida a fin de obtener una mejor separación y resolución de las proteínas del extracto TG. Como se observa en la Fig. 7, las proteínas del TG se resolvieron notoriamente mejor en estos geles, detectándose ahora con la tinción de plata unos 600 spots con pIs entre 5 y 9,6 y PMs entre 15 y 160 kDa.

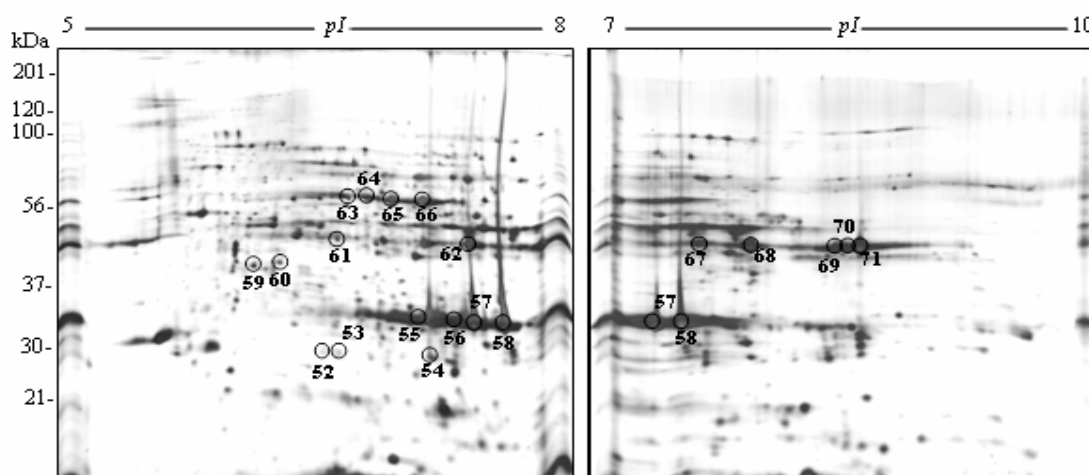


Figura 7. Electroforesis 2D de 25 μ g de extracto TG. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida teñidos con plata. Los números indican los spots que contenían proteínas antigénicas y que se analizaron por espectrometría de masas.

2.2. Proteínas antigénicas del extracto TG

La antigenicidad de las proteínas del extracto TG se estudió mediante western blot 2D a partir de geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida.

Los sueros anti-*S. bovis* revelaron 17 spots en el western blot de pH 5-8 y 5 spots adicionales en el western blot de pH 7-10 (Fig. 8). Los spots n° 57 y 58 se revelaron en ambas membranas, ya que, por sus pIs (7,4 y 7,5), se enfocan en ambos geles.

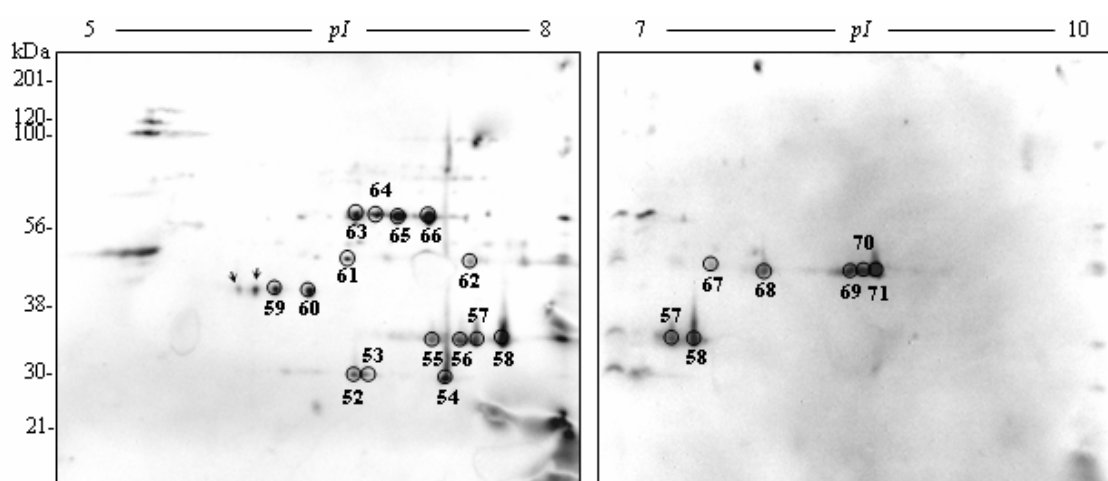


Figura 8. Western blots 2D de pH 5-8 y 7-10 y 12% acrilamida del extracto TG. Spots revelados por una mezcla de sueros de corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*. Los números indican los spots antigénicos que se analizaron por espectrometría de masas para su identificación. Las flechas indican dos spots antigénicos que no se pudieron localizar en su gel correspondiente.

Los sueros negativos no revelaron ningún spot en los correspondientes western blots 2D.

Estos resultados indican que aproximadamente el 4% de los spots del extracto TG contienen proteínas antigénicas.

El análisis de las imágenes de los western blots 2D y de sus geles homólogos nos permitió localizar en dichos geles 2D a 20 de los 22 spots antigénicos. Estos 20 spots, señalados en la Fig. 7, se cortaron y analizaron por espectrometría de masas para su identificación. La Tabla 3 recoge los resultados de dicho análisis.

Tabla 3. Identificación de las proteínas antigénicas del extracto TG mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos NCBI

Spot	Proteína	Especie	Nº acceso (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
52	SMA22.6 ^a	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/6.7	22	77
54	SMA22.6 ^a	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/7.2	14	82
55	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.1	28	115
56	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.3	49	195
57	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.4	41	166
58	Sb28GST	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.5	41	160
59	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/42	5.5/6.1	18	89
60	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/42	5.5/6.3	20	115
62	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.4	20	86
63	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/6.8	22	90
64	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/6.9	14	97
65	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/7.0	16	86
66	Enolasa	<i>S. japonicum</i>	P33676	48/62	6.2/7.2	24	125
67	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.6	17	100
68	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.9	21	90
69	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	21	115
70	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.5	17	81
71	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.6	17	134

SMA22.6, antígeno de tegumento; Sb28GST, glutatión S-transferasa de 28 kDa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF en combinación con los datos MS/MS.

Se han identificado 18 spots que corresponden a 5 proteínas: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina, Sb28GST, SMA 22.6 y enolasa. Estas tres últimas también están presentes en el extracto ES.

De cada proteína se identificaron entre 2 y 6 isoformas distintas. La enolasa fue identificada en 4 spots y en tres de ellos (63, 64 y 65) los péptidos tripticos coincidieron

con la enolasa de *S. mansoni* (AAC46886), mientras los del spot 66 coincidieron con la de *S. japonicum* (P33676). El resto de proteínas, salvo la Sb28GST, se identificaron por su similitud con las proteínas homólogas de *S. mansoni*.

2.3. Análisis cuantitativo del extracto TG e identificación de las proteínas mayoritarias no antigénicas.

Para realizar el estudio cuantitativo, las proteínas del TG se resolvieron en geles 2D de pH 5-8 y 7-10 que fueron teñidos con el colorante Sypro Ruby. El análisis de estos geles con el programa ImageMaster mostró que la proteína mayoritaria del TG es la proteína antigénica Sb28GST y que la enolasa y la GAPDH (ambas también antigénicas) son así mismo muy abundantes.

Los 25 spots mayoritarios no antigénicos, todos ellos con pIs entre 5 y 8, se señalan en la Fig. 9.

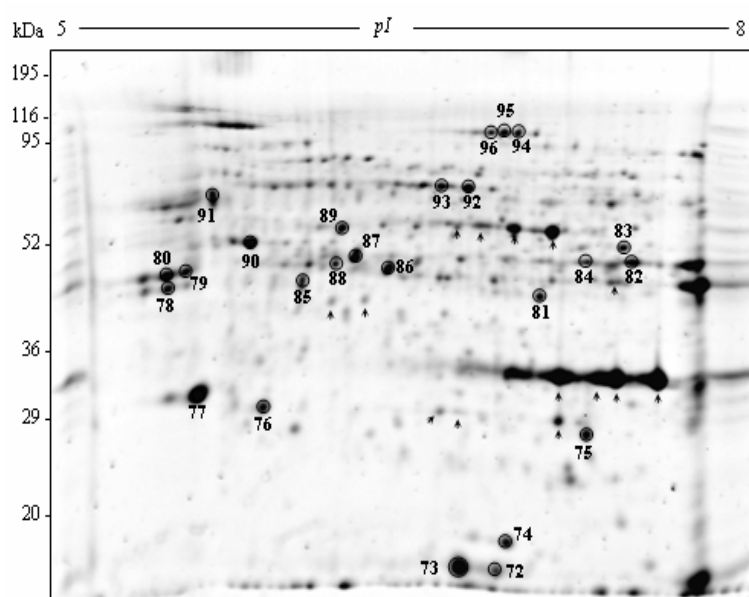


Figura 9. Electroforesis 2D de 25 µg de extracto TG. Gel de pH 5-8 y 12% acrilamida teñido con Sypro Ruby. Los números indican los 25 spots mayoritarios no antigénicos y las flechas los spots antigénicos identificados previamente.

El análisis por espectrometría de masas de estos 25 spots permitió la identificación de 16 de ellos que corresponden a 9 proteínas (Tabla 4): FABP, SOD, GAPDH, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FbisPA), actina, α -tubulina y tres proteínas desconocidas de *S. japonicum* que tienen similitud, respectivamente, con el precursor de la citrato sintasa (spot 83), inhibidor de la disociación del rab-GDP (spot 89) y

glucógeno fosforilasa (spots 94, 95 y 96). La secuencia de estas proteínas de *S. japonicum* son traducciones teóricas a partir de secuencias conocidas de cDNA del parásito.

La GAPDH, identificada en el spot 81 (Fig. 9), presenta un PM (42 kDa, Tabla 4) ligeramente inferior al que muestran las isoformas antigénicas de esta proteína (44 kDa, Tabla 3).

Las 4 isoformas no antigénicas de actina identificadas en este gel presentaron distintos pIs y pesos PMs entre sí (Tabla 4) y, a la vez, diferentes a los de las dos isoformas antigénicas de actina identificadas previamente (Tabla 3).

Por otra parte, la FABP y la SOD también están presentes en el ES.

Tabla 4. Identificación de las proteínas mayoritarias no antigénicas del extracto TG mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos NCBI.

Spot	Proteína	Especie	Nº acceso (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
72	FABP	<i>S. bovis</i>	AAT39384	15/16	7.8/6.9	37	104
73	FABP	<i>S. bovis</i>	AAT39384	15/16	7.8/6.7	32	101
74	SOD ^a	<i>S. mansoni</i>	Q01137	16/18	6.6/6.9	28	136
81	GAPDH ^b	<i>S. mansoni</i>	J10121	37/42	7.7/7.1	-	107
82	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/49	7.4/7.5	17	103
83	Similar CT ^b	<i>S. japonicum</i>	AAP06106	42/51	7.2/7.4	-	67
84	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/49	7.4/7.3	17	99
85	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAAC46886	42/46	5.5/6.0	23	95
86	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAAC46886	42/48	5.5/6.4	18	113
87	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAAC46886	42/50	5.5/6.3	29	152
89	Similar rabGDP ^b	<i>S. japonicum</i>	AAW27297	51/57	6.9/6.2	-	69
90	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAAC46886	42/52	5.5/5.8	29	172
91	α -tubulina	<i>S. mansoni</i>	A48433	50/69	5.1/5.7	25	136
94	Similar GP	<i>S. japonicum</i>	AAX27719	98/103	6.5/7.0	13	89
95	Similar GP	<i>S. japonicum</i>	AAX27719	98/103	6.5/6.9	15	96
96	Similar GP	<i>S. japonicum</i>	AAX27719	98/103	6.5/6.8	11	93

FABP, proteína unidora de ácidos grasos; SOD, superóxido dismutasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; FbisPA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; similar CT, similar al precursor de la citrato sintasa; similar rabGDP, similar al inhibidor de disociación del rabGDP; similar GP, similar a la glucógeno fosforilasa.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF y los datos MS/MS.

^b Spots identificados con datos MS/MS únicamente.

Los resultados de este apartado han sido publicados en el siguiente artículo (ver Anexo):

PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; RAMAJO-HERNÁNDEZ, A.; RAMAJO-MARTÍN, V.; OLEAGA, A. (2006).

Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms.

Proteomics, 6 (Suppl. 1): S226-S236.

II. GLICOMA Y GLICOPROTEOMA DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN Y DEL TEGUMENTO.

1. Glicoproteínas reconocidas por lectinas en el extracto de excreción-secreción (ES).

1.1. Western blot 1D con lectinas.

En SDS-PAGE teñido con nitrato de plata (Fig. 10A) el extracto ES muestra más de 30 bandas con un amplio rango de pesos moleculares (7-200 kDa).

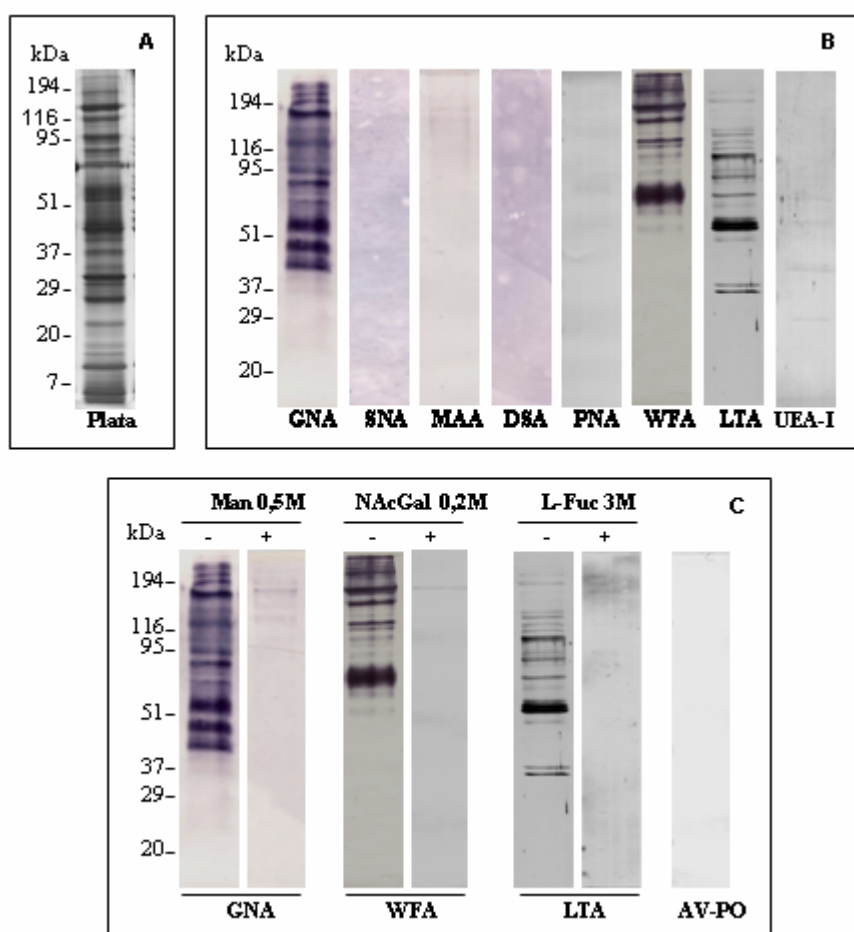


Figura 10. (A) SDS-PAGE 5-20% del extracto ES teñido con nitrato de plata. (B) Western blot 1D del extracto ES con las lectinas GNA, SNA, MAA, DSA, PNA, WFA, LTA y UEA-I. (C) Western blot 1D del extracto ES con las lectinas GNA, WFA y LTA en ausencia (-) o en presencia (+) del correspondiente monosacárido competidor: α -metil-D-manósido (Man), N-acetil-D-galactosamina (NAcGal) y L-fucosa (L-Fuc). AV-PO, extracto ES incubado directamente con avidina-peroxidasa.

Las bandas reconocidas en este extracto por las diferentes lectinas se pueden observar en la Fig. 10B. Cinco de esas lectinas (SNA, MAA, DSA, PNA y UEA-I) no reconocieron banda alguna, lo cual indica que los glicanos de las glicoproteínas del extracto ES carecen de ácido siálico (NeuNAc α), lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc), β -galactosil epítipo (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr) y Fuc α 1-2Gal β en posición terminal.

Por su parte, las lectinas GNA, WFA y LTA reconocieron con bastante intensidad a numerosas bandas con pesos moleculares medios y altos. La unión de estas tres lectinas a las glicoproteínas del extracto ES fue completamente inhibida por el correspondiente monosacárido competidor (α -metil-D-manósido, N-acetil-D-galactosamina y L-fucosa) y, además, no se reveló ninguna banda cuando el extracto ES fue incubado directamente con avidina-peroxidasa (Fig. 10C). Lo anterior verifica la especificidad de la unión lectina-glicoproteína y, consecuentemente, que las glicoproteínas del extracto ES son portadoras de abundantes residuos terminales de manosa (Man α 1-3Man α y/o Man α 1-6Man α y/o Man α 1-2Man α), de di-NAcetil-lactosamina (GalNAc β 1-4GlcNAc, LDN) y del motivo Fuc α 1-3GlcNAc.

1.2. Western blot 2D con lectinas e identificación de las glicoproteínas reconocidas.

El extracto ES se resolvió en geles 2D de pH 5-8 y 7-10 generando aproximadamente 400 spots con pIs de 5 a 9 y PMs entre 15 y 190 kDa (Fig. 11).

La lectina LTA se unió a numerosos spots (176), distribuidos en un amplio rango de pIs (5-9) y de PMs (32-190 kDa) (Fig. 12). Por el contrario, las lectinas GNA y WFA reconocieron sólo entre 20 y 25 spots, la mayoría de los cuales presentaban una distribución más restringida, con unos pIs de 5,0 a 5,7 y PMs de 47 a 190 kDa (Figs. 13 y 14).

El análisis de las imágenes de estos blots 2D y las de sus geles homólogos nos permitió localizar en dichos geles un total de 55 spots reconocidos por unas u otras lectinas (Fig. 11). Estos 55 spots fueron cortados de los geles y analizados por espectrometría de masas para su identificación.

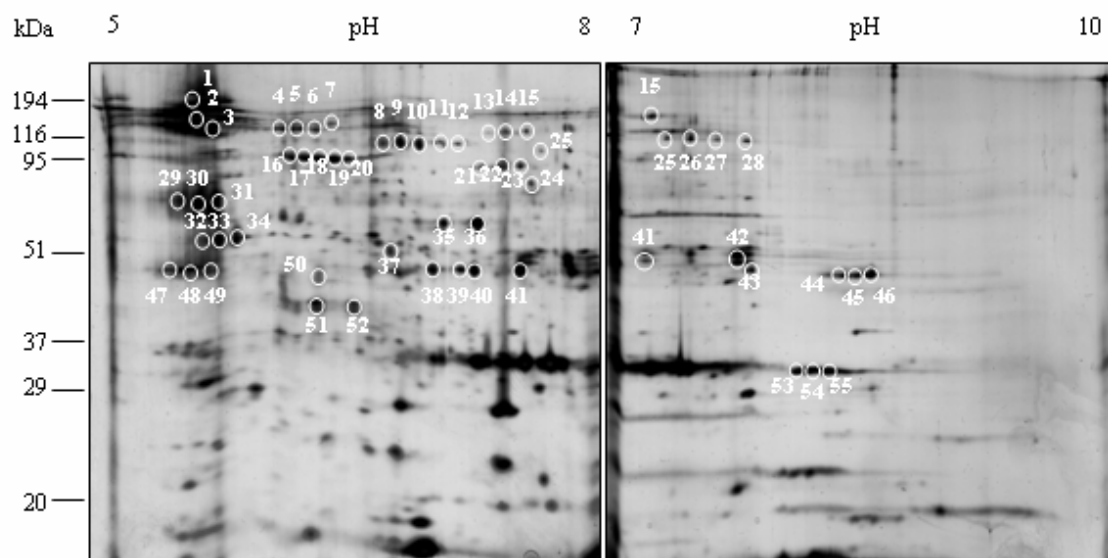


Figura 11. Electroforesis 2D del extracto ES. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida teñidos con plata. Los números indican los spots que contenían glicoproteínas reconocidas por una o varias lectinas. Estos spots se cortaron del gel y se analizaron por espectrometría de masas.

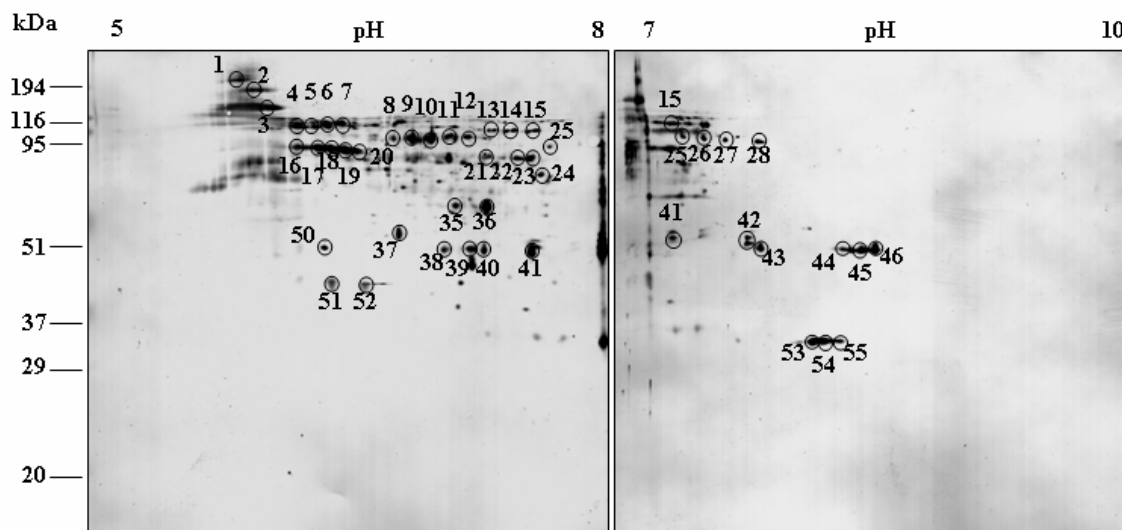


Figura 12. Western blot 2D del extracto ES con la lectina LTA. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida. Los números indican los spots reconocidos por LTA, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas.

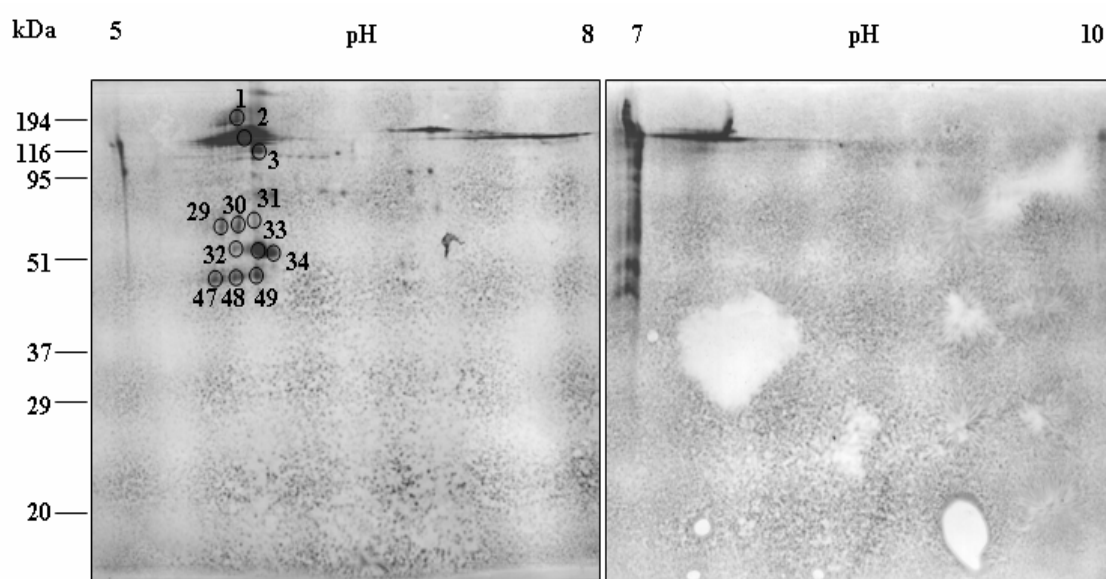


Figura 13. Western blot 2D del extracto ES con la lectina GNA. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida. Los números indican los spots reconocidos por GNA, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas.

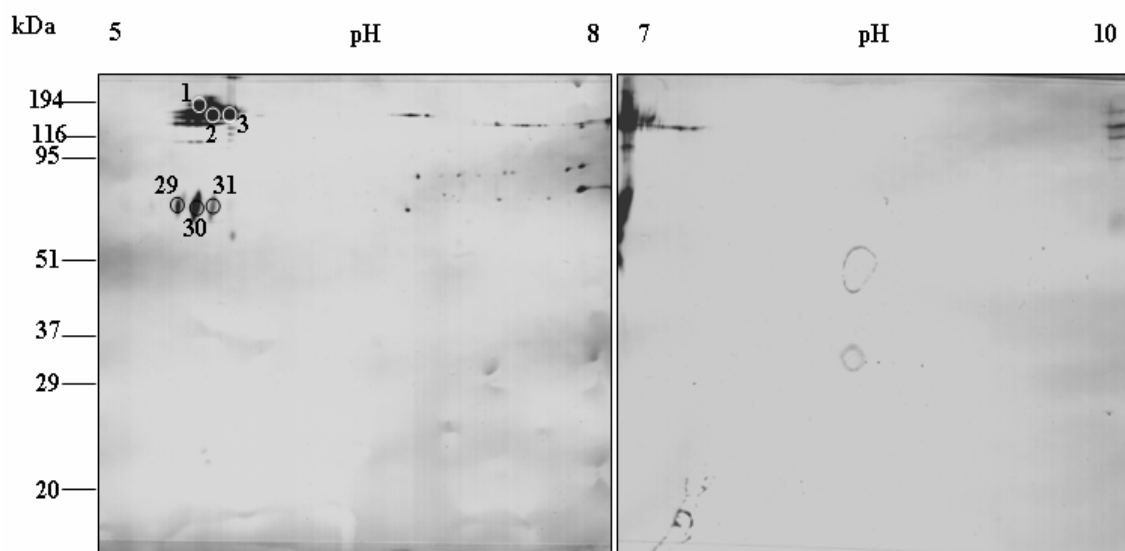


Figura 14. Western blot 2D del extracto ES con la lectina WFA. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida. Los números indican los spots reconocidos por WFA, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del análisis espectrométrico. De los 55 spots analizados se identificaron 34, los cuales correspondieron a 8 glicoproteínas diferentes; una del hospedador, la pre-pro-albúmina sérica (Pre-prOSA) y 7 del parásito: proteína de superficie del verme (SPF), ATP:guanidino cinasa (ATPGK), inhibidor de serina proteasa (serpina), enolasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FbisPA), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y catepsina B endopeptidasa (CBendo). De cada proteína se identificaron entre 2 y 9 isoformas.

Tabla 5. Identificación mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos NCBI^a de las glicoproteínas reconocidas por lectinas en el extracto ES.

Spot	Lectinas que lo reconocen	Proteína	Especie	Nº de acceso. (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
1	LTA, GNA, WFA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/191	4.7/5.1	6	94
2	LTA, GNA, WFA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/153	4.7/5.2	5	84
3	LTA, GNA, WFA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/123	4.7/5.1	6	90
32	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/51	4.7/5.5	7	101
33	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/52	4.7/5.6	6	83
34	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/52	4.7/5.7	5	83
47	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/46	4.7/5.4	6	86
48	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/46	4.7/5.5	6	90
49	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/47	4.7/5.6	7	101
16	LTA	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.0	19	120
17	LTA	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.1	13	84
18	LTA	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.2	14	96
19	LTA	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/88	5.8/6.62	16	105
20	LTA	Pre-prOSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/88	5.8/6.3	19	120
25	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/93	8.1/7.3	19	120
26	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/93	8.1/7.4	34	208
27	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/92	8.1/7.6	12	112
28	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/92	8.1/7.8	19	120

SPF, proteína de superficie del verme; Pre-prOSA, pre-pro albúmina serica ovina; ATPGK, ATP:guanidino cinasa; serpina, inhibidor de serina proteasa; FbisPA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; CBendo, cathepsina B endopeptidasa.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF y los datos MS/MS.

^b Spots identificados con datos MS/MS únicamente.

Tabla 5. (Continuación)

Spot	Lectinas que lo reconocen	Proteína	Especie	Nº de acceso. (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
29	GNA, WFA	Serpina ^b	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/66	4.9/5.4	-	47
30	GNA, WFA	Serpina ^b	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/65	4.9/5.5	-	49
31	GNA, WFA	Serpina ^a	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/66	4.9/5.6	19	88
35	LTA	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/57	6.2/6.9	10	111
36	LTA	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/57	6.2/7.1	17	113
38	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/6.8	49	225
39	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.0	17	99
40	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.1	49	225
41	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.4	51	228
42	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.7	51	230
43	LTA	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.8	21	90
44	LTA	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	21	115
45	LTA	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.5	17	81
46	LTA	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.6	17	134
51	LTA	CBendo	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.2	21	88
52	LTA	CBendo	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.4	19	86

SPF, proteína de superficie del verme; Pre-prOSA, pre-pro albúmina serica ovina; ATPGK, ATP:guanidino cinasa; serpina, inhibidor de serina proteasa; FbisPA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; CBendo, catepsina B endopeptidasa.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF y los datos MS/MS.

^b Spots identificados con datos MS/MS únicamente.

La lectina LTA reconoció a todas estas glicoproteínas excepto a la serpina y a las isoformas de la SPF de bajo peso molecular (46-52 kDa). Estas isoformas pequeñas de la SPF tampoco fueron reconocidas por los sueros de los corderos infectados con *S. bovis*, a diferencia de sus isoformas de alto peso molecular (102-194 kDa) que sí resultaron antigénicas (ver Tabla 1). Por su parte, la lectina GNA reconoció a la serpina y a todas las isoformas de la SPF, mientras que la lectina WFA reconoció también a la serpina, y de las isoformas de SPF sólo a las de alto peso molecular.

2. Glicoproteínas reconocidas por lectinas en el extracto TG.

2.1. Western blot 1D con lectinas.

En SDS-PAGE teñido con nitrato de plata (Fig. 15A) el extracto TG muestra más de 30 bandas con un amplio rango de pesos moleculares (7-200 kDa).

Las bandas reconocidas en este extracto por las diferentes lectinas se pueden observar en la Fig. 15B. Cinco de esas lectinas (SNA, MAA, DSA, PNA y WFA) no reconocieron banda alguna o lo hicieron de forma débil e irregular, por lo que se consideró un reconocimiento inespecífico. La falta de reactividad con estas cinco lectinas indica que los glicanos de las glicoproteínas del extracto TG carecen de ácido siálico (NeuNAc α), lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc), β -galactosil epítipo (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr) y di-NAcetil-lactosamina (GalNAc β 1-4GlcNAc, LDN) en posición terminal. Una sexta lectina, la GNA reconoció una banda ancha de unos 55 kDa (Fig. 15B), que no desapareció en el ensayo de inhibición con α -metil-D-manósido (Fig. 15C). Esto significa que ese reconocimiento es inespecífico y que, consecuentemente, las glicoproteínas del extracto TG no son portadoras de residuos terminales de manosa.

Por su parte, las lectinas LTA y UEA-I reconocieron con intensidad a numerosas bandas con pesos moleculares medios y altos (Fig. 15B). La unión de estas dos lectinas a las glicoproteínas del extracto TG fue completamente inhibida por el correspondiente monosacárido competidor (L-fucosa) y, además, no se reveló ninguna banda cuando el extracto TG se incubó directamente con avidina-peroxidasa (Fig. 16C). Lo anterior confirma la especificidad de la unión lectina-glicoproteína y muestra que los glicanos de las glicoproteínas del extracto TG tienen abundantes motivos Fuc α 1-3GlcNAc y Fuc α 1-2Gal β en posición terminal o subterminal.

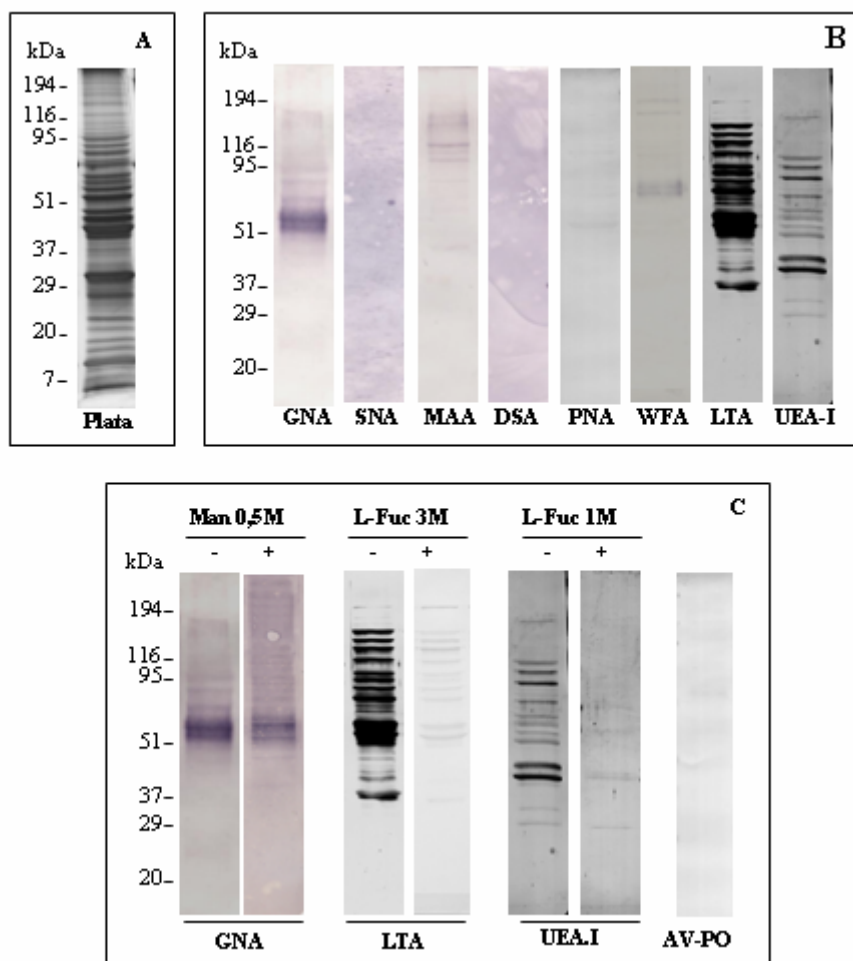


Figura 15. (A) SDS-PAGE 5-20% del extracto TG teñido con nitrato de plata. (B) Western blot 1D del extracto TG con las lectinas GNA, SNA, MAA, DSA, PNA, WFA, LTA y UEA-I. (C) Western blot 1D del extracto TG con las lectinas GNA, LTA y UEA-I en ausencia (-) o en presencia (+) del correspondiente monosacárido competidor: α -metil-D-manósido (Man) y L-fucosa (L-Fuc). AV-PO, extracto TG incubado directamente con avidina-peroxidasa.

2.2. Western blot 2D con lectinas e identificación de las glicoproteínas reconocidas

El extracto TG se resolvió en geles 2D de pH 5-8 y 7-10 generando más de 600 spots, cuyos pIs y PMs estaban comprendidos en un rango de pH de 5 a 9,5 y 15-160 kDa (Fig. 16).

La lectina LTA se unió a unos 167 spots del extracto TG (Fig. 17). Estos spots presentaron un amplio rango de pIs (5,9-9,5) y unos PMs medio-altos (44-98 kDa). Por su parte, la lectina UEA-I mostró un patrón de reconocimiento de spots muy similar al de la LTA (Fig. 18).

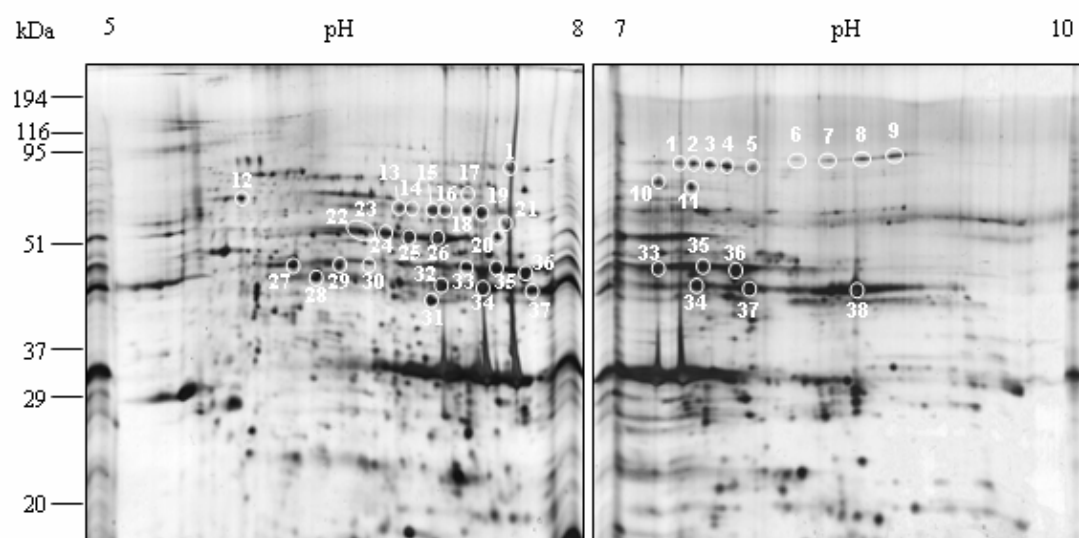


Figura 16. Electroforesis 2D del extracto TG. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida teñidos con plata. Los números indican los spots que contenían glicoproteínas reconocidas por las lectinas LTA y/o UEA-I. Estos spots se cortaron del gel y se analizaron por espectrometría de masas.

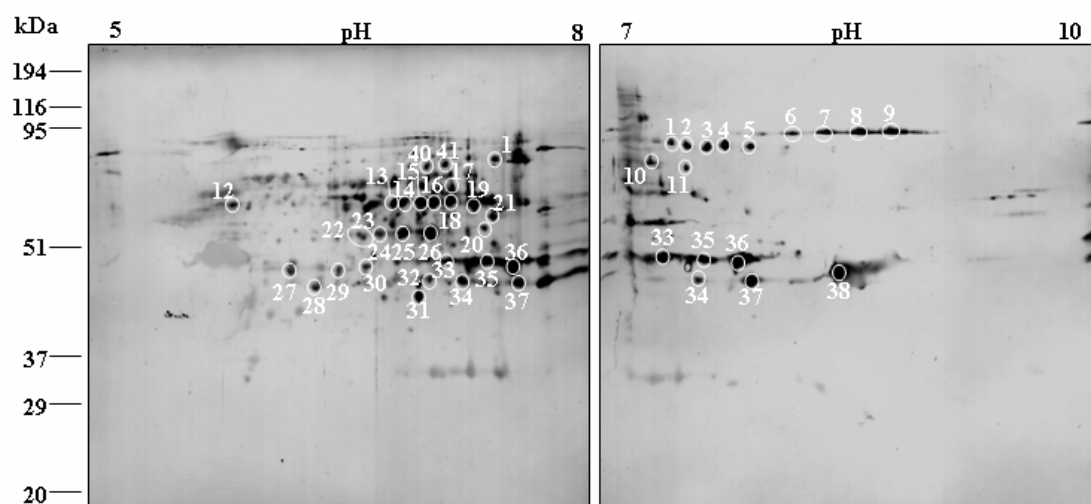


Figura 17. Western blot 2D del extracto TG con la lectina LTA. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida. Los números indican los spots reconocidos por LTA, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas.

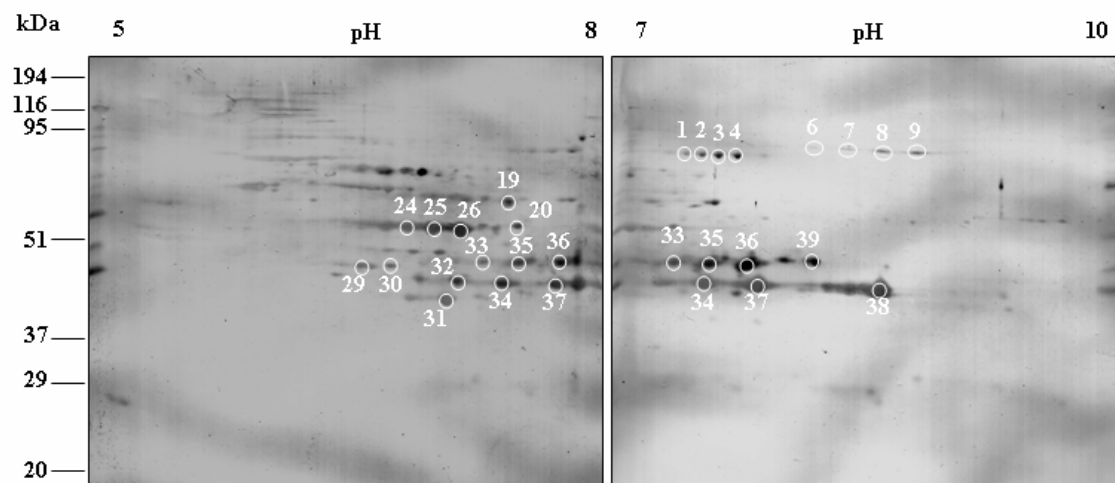


Figura 18. Western blot 2D del extracto TG con la lectina UEA-I. Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida. Los números indican los spots reconocidos por UEA-I, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas.

El análisis de las imágenes de estos blots 2D y las de sus geles homólogos teñidos con plata nos permitió localizar en dichos geles un total de 38 spots reconocidos por una u otra lectina o ambas (Fig. 16). Estos 38 spots fueron cortados de los geles y analizados por espectrometría de masas para su identificación.

Como se puede observar en la Tabla 6, de los 38 spots analizados 20 pudieron ser identificados, que se correspondieron con 5 glicoproteínas parasitarias: ATP:guanidino cinasa (ATPGK), enolasa, actina, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FbisPA) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

De cada una de estas glicoproteínas se identificaron entre 2 y 7 isoformas. Todas las isoformas identificadas fueron reconocidas por ambas lectinas, LTA y UEA-I, excepto las dos isoformas de actina, que sólo fueron reconocidas por la LTA.

Tabla 6. Identificación mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos NCBI de las glicoproteínas reconocidas por lectinas LTA y UEA-I en el extracto TG.

Spot	Lectina que los reconoce	Proteína	Especie	Nº de acceso. (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
2	LTA, UEA-I	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/90	8.1/7.7	19	120
3	LTA, UEA-I	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/90	8.1/7.8	34	208
4	LTA, UEA-I	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/89	8.1/8.0	12	112
22	LTA, UEA-I	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/6.7	22	90
23	LTA, UEA-I	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/6.7	10	111
24	LTA, UEA-I	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/6.8	14	97
25	LTA, UEA-I	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/7.0	16	86
26	LTA, UEA-I	Enolasa	<i>S. japonicum</i>	P33676	48/58	6.2/7.2	24	125
29	LTA, UEA-I	Enolasa ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.6	-	61
30	LTA, UEA-I	Enolasa ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.8	-	82
27	LTA	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/48	5.5/6.2	29	152
28	LTA	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/46	5.5/6.4	18	113
33	LTA, UEA-I	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/48	7.4/7.4	51	228
35	LTA, UEA-I	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/48	7.4/7.6	17	99
36	LTA, UEA-I	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/48	7.4/7.7	51	230
31	LTA, UEA-I	GAPDH ^b	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/42	7.7/7.1	-	107
32	LTA, UEA-I	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.2	22	119
34	LTA, UEA-I	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.6	17	81
37	LTA, UEA-I	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.8	21	90
38	LTA, UEA-I	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	21	115

ATPGK, ATP:guanidino cinasa; FbisPA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF y los datos MS/MS.

^b Spots identificados con datos MS/MS únicamente.

3. Glicoproteínas reconocidas por lectinas en ambos extractos (ES y TG).

En conjunto hemos identificado a 8 glicoproteínas parasitarias expresadas por el verme adulto en la interfase con el hospedador. Cuatro de ellas (ATPGK, enolasa, FbisPA y GAPDH) fueron identificadas en ambos extractos; otras tres (SPF, serpina y CBendo) fueron identificadas sólo en el extracto ES, y la restante, la actina, sólo se identificó en el extracto TG.

Todas estas glicoproteínas, excepto la serpina, son reconocidas por la lectina LTA, lo que significa que todas ellas, salvo la serpina, son portadoras del motivo glicánico $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3GlcNAc}$.

Por el contrario, sólo la serpina y las isoformas de alto peso molecular de la SPF son reconocidas por las lectinas GNA y WFA, lo que significa que estas dos glicoproteínas son las únicas portadoras de glicanos con residuos terminales de manosa y con el motivo $\text{GalNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ (LDN).

Por último, aunque se identificaron isoformas de ATPGK, enolasa, FbisPA y GAPDH en ambos extractos, sólo las isoformas presentes en el extracto TG fueron reconocidas por la lectina UEA-I, señalando así que sólo dichas isoformas contienen en sus glicanos la secuencia terminal $\text{Fuc}\alpha 1\text{-2Gal}\beta$.

4. Glicoproteínas reconocidas por anticuerpos anti-glicanos en los extractos ES y TG.

4.1. Western blot 1D con los anticuerpos anti-KLH, anti- Le^X y anti- Le^Y .

El anticuerpo anti-KLH no reconoció ninguna banda ni en el extracto ES ni en el extracto TG (Fig. 19), lo que indica que los epítomos F-LDN(-F) ($\text{Fuc}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4(Fuc}\alpha 1\text{-3)GlcNAc}\beta 1$) no son expresados en las glicoproteínas de ninguno de estos dos extractos.

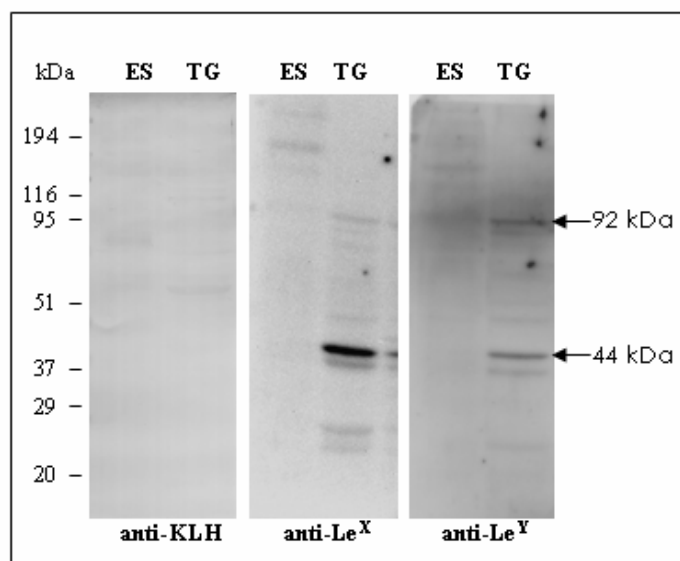


Figura 19. Western blots 1D del extracto ES frente al suero policlonal anti-KLH (desarrollado con 4-Cl-1-naftol) y frente a los anticuerpos monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y (desarrollados con luminol).

Por su parte, los anticuerpos monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y tampoco reconocieron ninguna banda en el extracto ES, pero si reconocieron bandas en el extracto TG. De hecho, ambos monoclonales reconocieron en esencia las mismas bandas: una bien visible de unos 44 kDa y otra menos intensa de unos 92 kDa (Figura 19).

4.2. Inmunoprecipitación e identificación de las glicoproteínas del extracto TG portadoras de grupos Le^X y Le^Y.

Los monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y se utilizaron como sondas específicas para separar por inmunoprecipitación a las glicoproteínas del extracto TG portadoras de estos grupos Lewis. Para ello, los monoclonales se inmovilizaron sobre una fase sólida, la sefarosa 4B recubierta de proteína G. La Fig. 20A muestra que la proteína G-sefarosa 4B unió eficientemente a ambos monoclonales y que, por el contrario, no capturó directamente a ninguna proteína del extracto TG.

Consecuentemente, incubamos a continuación el extracto TG con uno y otro monoclonal inmovilizados sobre la proteína G-sefarosa 4B y examinamos los resultados de la inmunoprecipitación por SDS-PAGE. La Fig. 20B muestra que ambos monoclonales capturaron las dos bandas de 44 y 92 kDa previamente reveladas por western blot.

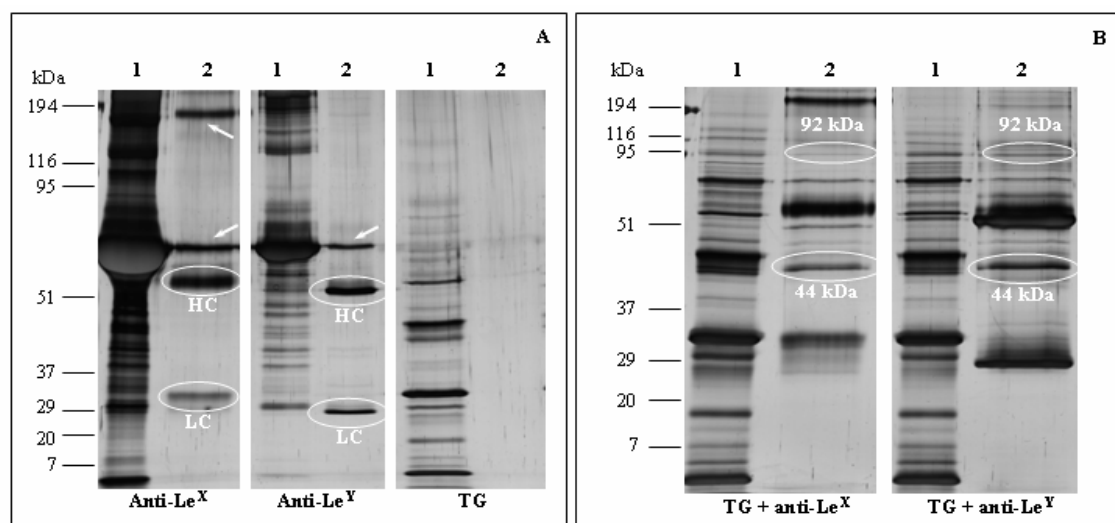


Figura 20. (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de los sobrenadantes (1) y sedimentos (2) de la reacción de unión de los monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y, y del extracto TG, a la proteína G-sefarosa 4B. HC y LC son, respectivamente, las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos. Las flechas blancas señalan algunas impurezas que también se unieron a la fase sólida. (B) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de los sobrenadantes (1) y sedimentos (2) de la inmunocaptura de las glicoproteínas del extracto TG portadoras de estos grupos Lewis. Las glicoproteínas capturadas se han señalado en blanco, junto con su peso molecular aparente.

Tras haber comprobado la eficacia de las inmunocapturas, ambos sedimentos fueron separados por electroforesis 2D en geles de pH 5-8 y 7-10 y en ambos casos se observó exactamente el mismo resultado (Fig. 21): las dos bandas de 92 kDa se separaron, cada una, en tres pequeños spots (los señalados con los números 1 a 3 y 9 a 11); por su parte, las dos bandas de 44 kDa se separaron, cada una, en cinco spots (los señalados con los números 4 a 8 y 12 a 16).

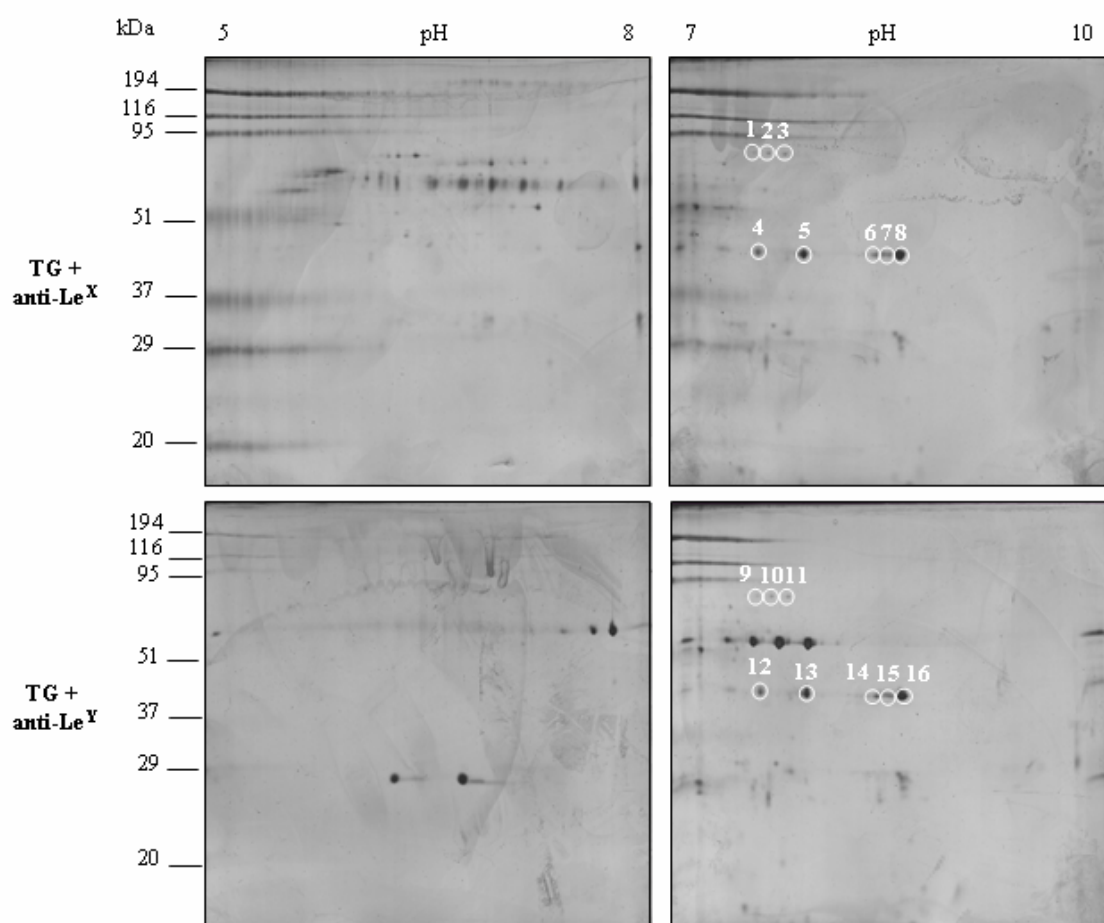


Figura 21. Electroforesis 2D de los sedimentos de la inmunocaptura de las proteínas del TG portadoras de grupos Le^X y Le^Y . Geles de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida teñidos con plata. Los números indican los spots correspondientes a las glicoproteínas capturadas, los cuales fueron analizados por espectrometría de masas.

Todos estos spots fueron cortados de los geles e identificados por espectrometría de masas. La Tabla 7 muestra que los spots números 1-3 y 9-11 fueron identificados como ATP:guanidino cinasa (ATPGK) y que los spots números 4-8 y 12-16 fueron todos ellos identificados como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 7. Identificación mediante MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos NCBI de las glicoproteínas del extracto TG portadoras de grupos Le^x y Le^y.

Spot	Proteína	Especie	Nº de acceso. (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
1, 9	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/90	8.1/7.7	19, 21	120, 123
2, 10	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/99	8.1/7.8	30, 34	201, 208
3, 11	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/89	8.1/8.0	12, 16	112, 118
4, 12	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.6	22, 27	100, 115
5, 13	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.9	21, 26	90, 115
6, 14	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.3	23, 25	115, 115
7, 15	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	15, 17	78, 81
8, 16	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.5	28, 29	134, 139

ATPGK, ATP:guanidino cinasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

5. Reconocimiento de glicoproteínas en extractos proteicos de cercarias y huevos de *S. bovis* por el suero policlonal anti-KLH.

Ante la ausencia de los grupos glicánicos F-LDN(-F) en las glicoproteínas de los extractos ES y TG de los vermes adultos, quisimos comprobar si *S. bovis* expresa dichos grupos en otras fases evolutivas de su ciclo biológico. La comprobación se hizo analizando por western blot la reactividad de los extractos proteicos solubles e insolubles de cercarias y huevos de *S. bovis* frente al suero anti-KLH.

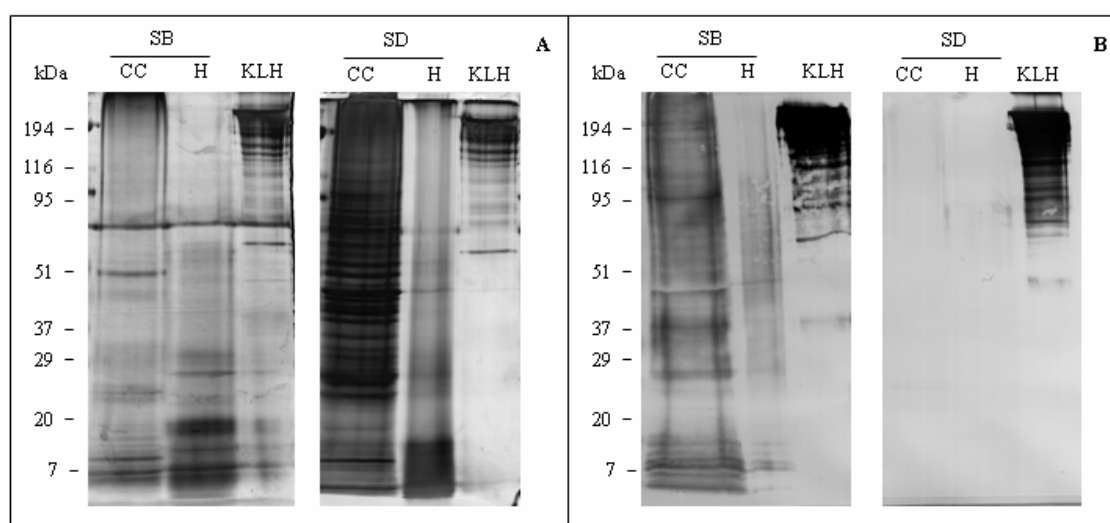


Figura 22. (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de los sobrenadantes (SB) y sedimentos (SD) de 100.000 g de los homogenados de cercarias (CC) y huevos (H) de *S. bovis*. (B) Western blot de los extractos anteriores con el suero policlonal anti-KLH. KLH, Keyhole Limpet haemocyanin (hemocianina de la lapa gigante californiana), usada como control positivo con el suero anti-KLH.

La Fig. 22 muestra que el suero anti-KLH reconoció numerosas bandas en el extracto soluble de cercarias y, más débilmente, algunas bandas en el extracto soluble de huevos, evidenciando la presencia de glicoproteínas portadoras de grupos F-LDN(-F) en estas dos fases evolutivas. Llamativamente, este mismo suero no reconoció banda alguna en los correspondientes extractos insolubles de cercarias y huevos (Fig. 22).

6. Respuesta inmunitaria humoral anti-ES y anti-TG y presencia de anticuerpos anti-Le^X, anti-Le^Y y anti-F-LDN(-F) en el suero de corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

En este experimento se analizó la respuesta humoral en tres de los corderos infectados experimentalmente con *S. bovis* y se observó que los tres animales desarrollaron respuestas humorales similares.

La Fig. 23 muestra que los tres corderos presentaban altos niveles de IgG e IgM anti-ES. Los niveles máximos de IgG anti-ES se alcanzaron en torno a la semana 8 post-infección (p.i.), mientras que los niveles máximos de IgM anti-ES se alcanzaron antes, en torno a la semana 4 p.i.. Después, ambos isotipos mantuvieron sus altos niveles más o menos constantes hasta el sacrificio de los corderos en la semana 24 p.i..

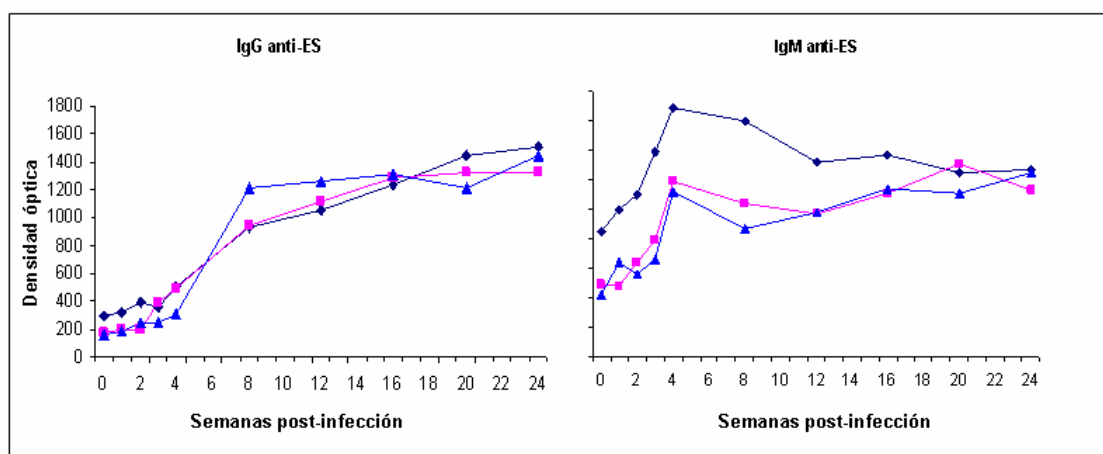


Figura 23. Curvas de anticuerpos IgG e IgM anti-ES en tres corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

La respuesta anti-TG se observa en la Fig. 24. Los tres corderos mostraron niveles moderados de IgG e IgM anti-TG, y ambos isotipos experimentaron un lento pero constante incremento desde la semana 0 a la semana 24 p.i..

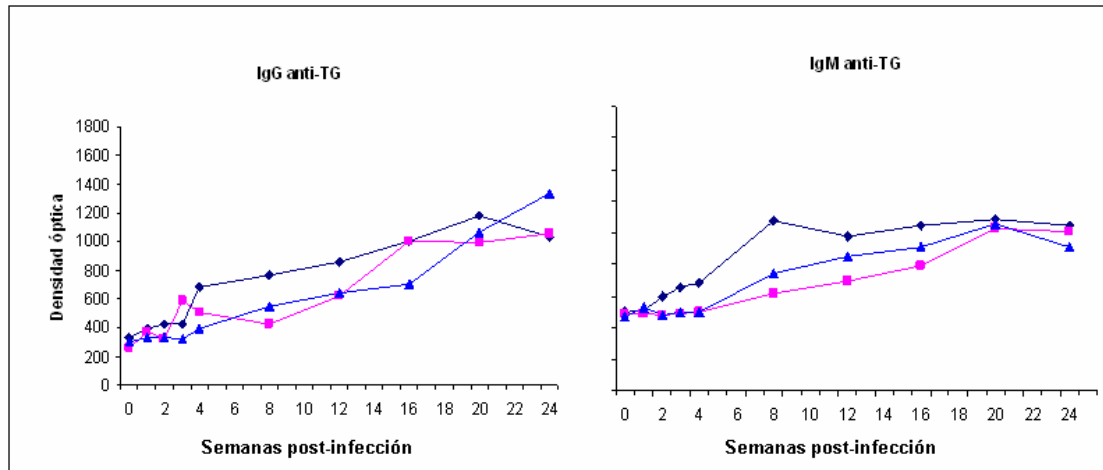


Figura 24. Curvas de anticuerpos IgG e IgM anti-TG en tres corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

La Fig. 25 muestra la respuesta anti-KLH. Todos los corderos desarrollaron altos niveles de IgG anti-KLH. Este isotipo alcanzó el máximo entre las semanas 4 y 8 p.i. y se mantuvo constante en altos niveles hasta el sacrificio de los animales. Por su parte, la IgM anti-KLH mostró niveles más bajos. Este isotipo alcanzó el máximo en la semana 4 p.i. y el mínimo entre las semanas 8 y 12 p.i.. Después de ese punto sus niveles experimentaron un ligero incremento hasta la semana 24 p.i..

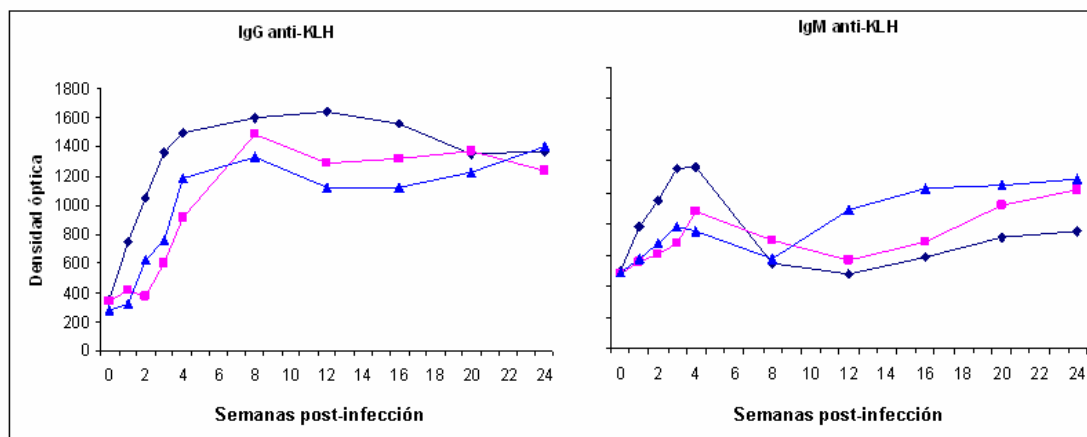


Figura 25. Curvas de anticuerpos IgG e IgM anti-KLH en tres corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

En relación con el grupo Le^x, (Fig. 26), los tres corderos mostraron niveles medios de anticuerpos frente a este epítipo. La IgG anti-Le^x alcanzó el máximo entre las semanas 4 y 8 p.i. y después decreció, pero se mantuvo en niveles detectables hasta la semana 24 p.i.. La IgM anti-Le^x alcanzó el máximo antes, en la semana 4 p.i., y

después descendió suavemente manteniéndose también en niveles detectables hasta la semana 24 p.i..

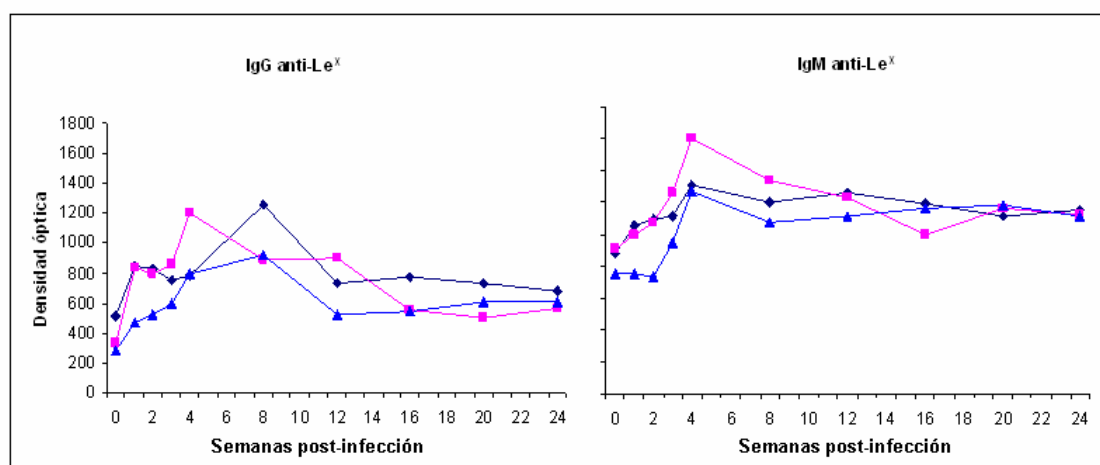


Figura 26. Curvas de anticuerpos IgG e IgM anti-Le^X en tres corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

Por último, en relación con el grupo Le^Y, la Fig. 27 muestra claramente que los tres corderos analizados desarrollaron anticuerpos frente a este epítipo y que la cinética de la respuesta humoral anti-Le^Y fue muy similar a la de la respuesta anti-TG.

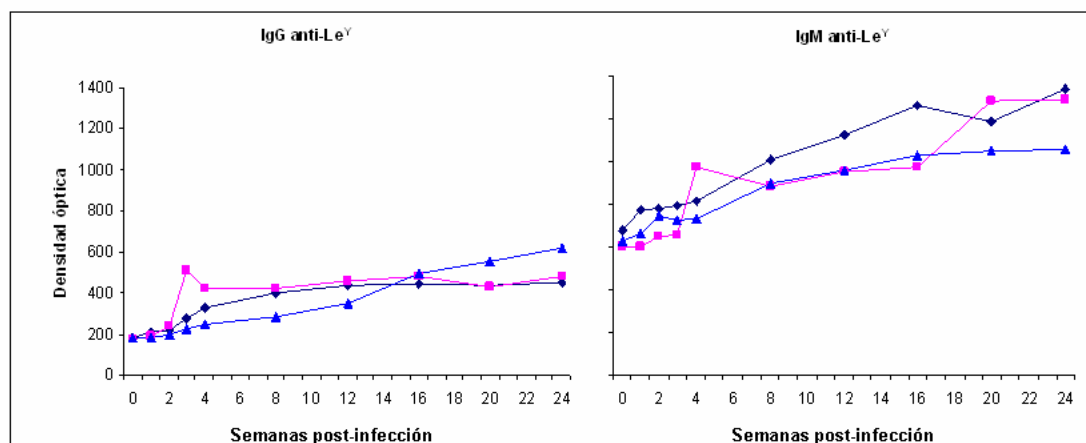


Figura 27. Curvas de anticuerpos IgG e IgM anti-Le^Y en tres corderos infectados experimentalmente con *S. bovis*.

En los tres animales los niveles de ambos isotipos, IgG e IgM anti-Le^Y, aumentaron lenta pero constantemente desde la semana 0 p.i. hasta la semana 24 p.i.. En el momento en que los animales fueron sacrificados, sus niveles de anticuerpos anti-Le^Y alcanzaban valores 2 a 3 veces superiores al nivel previo a la infección.

Los resultados de este apartado han sido publicados en el siguiente artículo (ver Anexo):

RAMAJO-HERNÁNDEZ, A.; OLEAGA, A.; RAMAJO-MARTÍN, V.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. (2007)

Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms.

Veterinary Parasitology, 144: 45-60.

III. INTERACCIÓN ENTRE EL TEGUMENTO DE *SCHISTOSOMA BOVIS* Y EL PLASMINÓGENO.

1. Unión del plasminógeno a las proteínas del tegumento.

1.1. ELISA

Los resultados de la prueba de ELISA muestran claramente que el plasminógeno se une a proteínas del extracto TG y que la cantidad de plasminógeno que se une a 1 μg de proteína aumenta a medida que se incrementa la cantidad de plasminógeno añadido a la reacción. En los pocillos control, únicamente tapizados con BSA (sin TG), se observa un cierto grado de unión inespecífica de plasminógeno que, sin embargo, no se observó en los blotting 1D (véase más adelante). En los experimentos de competición, la inclusión de ϵACA 40 mM inhibió la unión del plasminógeno al TG, registrándose en estos pocillos una reactividad similar a la observada en los pocillos control. (Fig. 28).

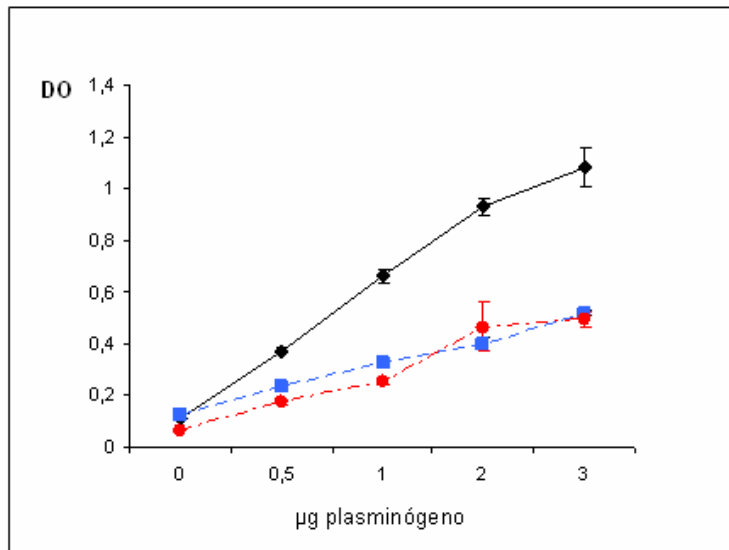


Figura 28. Determinación de la unión del plasminógeno a 1 μg de proteína del extracto TG de *Schistosoma bovis*, mediante la técnica de ELISA. (♦) Incubación con cantidades crecientes (0 – 3 μg) de plasminógeno. (■) Ensayo de competición en el que se incluye ϵACA 40mM durante la incubación con el plasminógeno. (●) Pocillos control sin TG, tapizados sólo con BSA. En cada punto se representa la media de tres valores \pm desviación estándar.

1.2. Blotting 1D con plasminógeno

Una vez determinado mediante ELISA que el tegumento de *S. bovis* contiene componentes a los que se une el plasminógeno, nos propusimos confirmar dicha interacción e iniciar la identificación de dichos componentes. Para ello, separamos por electroforesis las proteínas del TG y tras su transferencia a membranas de nitrocelulosa realizamos el blotting de unión a plasminógeno. Como se había visto ya en ensayos anteriores la tinción con plata del TG muestra que dicho extracto tiene una composición relativamente compleja y revela al menos 24 bandas de distintas intensidades, con unos pesos moleculares entre 17 y 116 kDa (Fig. 29, tira 1). El blotting del extracto TG con plasminógeno reveló al menos 13 bandas con pesos moleculares comprendidos entre 31 y 94 kDa (Fig. 29, tira 2). En las tiras control, números 3 y 4, que no incluyeron TG o plasminógeno respectivamente, no se reveló ninguna banda.

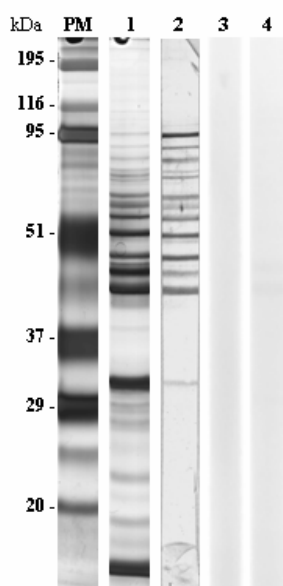


Figura 29. Electroforesis de las proteínas del TG y blotting con plasminógeno. **1**, SDS-PAGE teñido con plata. **2**, blotting con 35 µg/ml de plasminógeno. **3**, control sin TG. **4**, control sin plasminógeno.

2. Efecto del extracto TG en la activación del plasminógeno.

En este ensayo investigamos si el extracto TG es capaz de modificar la activación del plasminógeno inducida por un activador fisiológico, como es el t-PA, y al mismo tiempo si los componentes del tegumento tienen, por sí mismos, capacidad para activar el plasminógeno y generar plasmina.

Para hacer estas comprobaciones, se añadieron cantidades crecientes de proteínas del extracto TG, desde 1 hasta 12 μg , a una mezcla de plasminógeno y del activador t-PA, y a continuación se midió la cantidad de plasmina generada en la reacción. Como se puede ver en la Fig. 30, la cantidad de plasmina que se detecta en presencia de t-PA se incrementa con la adición de cantidades crecientes de proteína del extracto TG, lo que indica que en el tegumento hay algún componente que potencia la activación inducida por el t-PA. Además, en ausencia del activador t-PA también se generó plasmina, lo que indica que el extracto TG tiene componentes con capacidad para activar el plasminógeno por sí mismos.

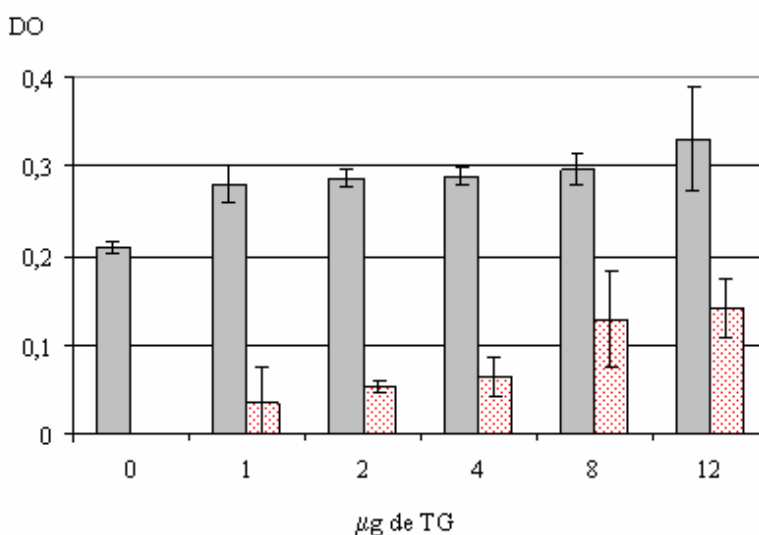


Figura 30. Activación del plasminógeno en presencia de proteínas del tegumento de vermes adultos de *S. bovis*. (■) Con 10 nM de t-PA; (▨) sin t-PA. Cada barra representa la media de tres valores \pm desviación estándar.

3. Unión del plasminógeno a la superficie de los vermes.

Para que la fijación y consiguiente activación del plasminógeno tenga un efecto en la biología del parásito es necesario que la o las moléculas implicadas en dicha interacción estén presentes en la superficie de los vermes, en contacto con la sangre del hospedador. Por este motivo hemos analizado la presencia de ligandos de plasminógeno en la superficie del tegumento.

Este estudio se ha llevado a cabo mediante el análisis por microscopía confocal tras la incubación de los vermes adultos con plasminógeno y un anticuerpo anti-plasminógeno marcado con fluoresceína. Los ensayos se realizaron paralelamente con vermes fijados con formalina y con vermes no fijados vivos, obteniéndose en ambos casos los mismos resultados.

Tal y como se observa en la Fig. 31, las imágenes proyectadas y las secciones de planos intermedios mostraron claramente que el plasminógeno se une a la superficie de los machos. Se observó una intensa señal fluorescente en las protuberancias o crestas del tegumento a lo largo de todo el cuerpo del verme, siendo más intensa en el extremo anterior, alrededor de la ventosa oral (Fig. 31A, B, D y E). En las hembras no se observó señal fluorescente, lo que parece indicar que éstas no expresan ligandos de plasminógeno en su tegumento.

En los experimentos de inhibición competitiva se observó que la unión del plasminógeno fue completamente inhibida por el ϵ ACA, lo que indica que la unión plasminógeno-ligando se realiza a través de residuos de lisina (Fig. 31C y F).

En los experimentos control, en los cuales se omitió la incubación con plasminógeno, con el anticuerpo fluorescente o con ambos, no se observó ningún tipo de señal fluorescente (imágenes no mostradas).

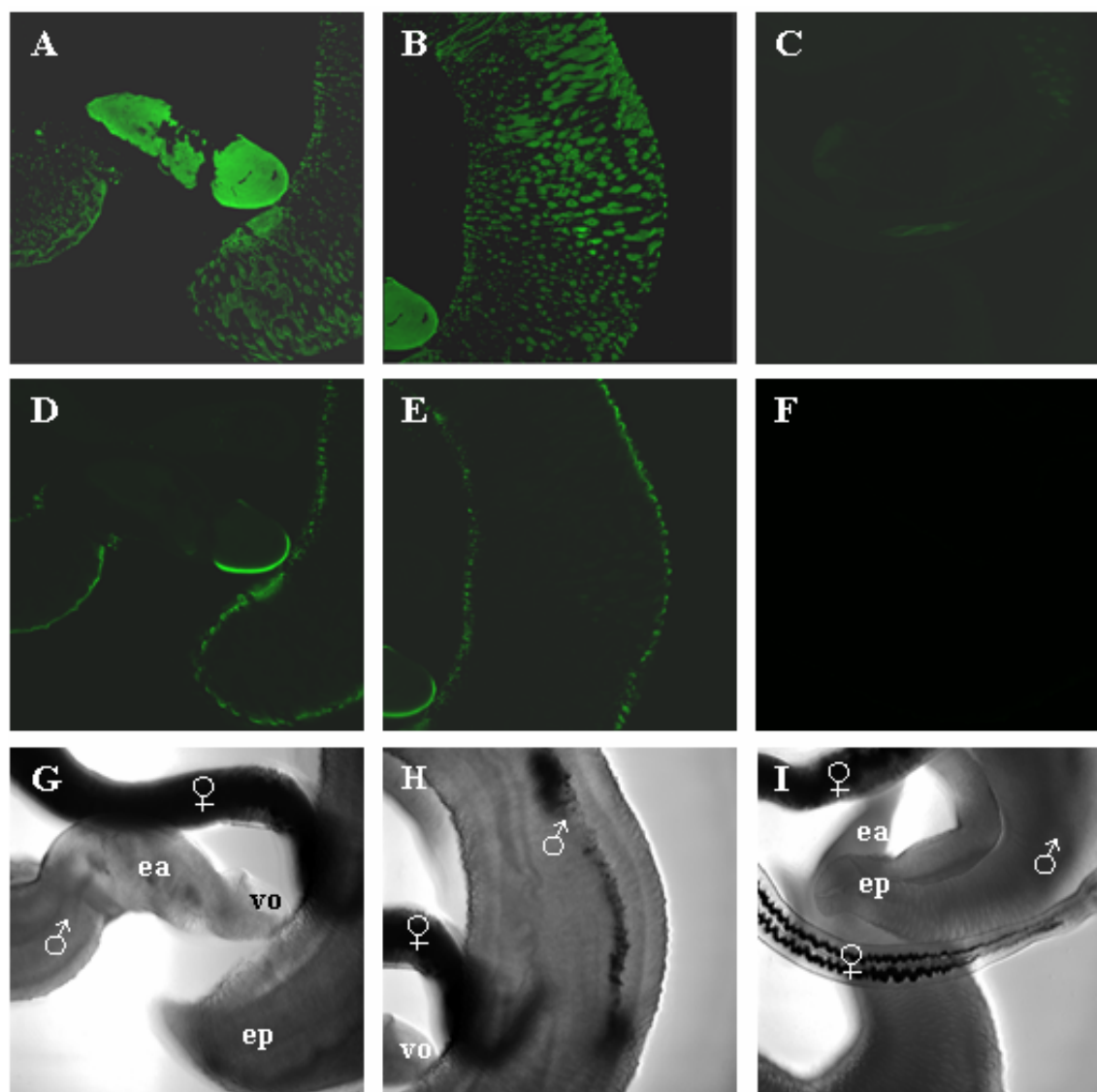


Figura 31. Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Unión del plasminógeno a la superficie de los vermes adultos de *S. bovis*. (A, B y C), Imágenes proyectadas obtenidas por microscopía confocal. (D, E y F), Imágenes de secciones de planos medios. (G, H e I), Imágenes de luz transmitida correspondientes a los paneles fluorescentes. (C y F) Resultados del experimento de inhibición competitiva en el que se incluye ϵ ACA 40 mM durante la incubación con plasminógeno. ♀, hembra; ♂, macho; ea, extremo anterior; ep, extremo posterior; vo, ventosa oral.

4. Identificación por espectrometría de masas de las proteínas fijadoras de plasminógeno en el extracto TG.

Las proteínas del extracto TG se separaron en geles 2D de rangos de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida. Tras teñirlos con plata, se observaron aproximadamente 450 spots, con pI entre 5,5 y 9,6 y PM entre 15 y 144 kDa (Fig. 32A y B). En paralelo, unos geles similares se transfirieron a membranas de nitrocelulosa sobre las que se realizó el

blotting con plasminógeno. Como se muestra en la Fig. 32C y D, en estas membranas se revelaron una serie de spots con PM entre 29 y 88 kDa y pIs de 5,9-8,8. En los blots control, en los que se omitió la incubación con el plasminógeno o con el anticuerpo anti-plasminógeno no se reveló ningún spot, lo que descarta posibles señales inespecíficas (imágenes no mostradas).

El análisis de las imágenes bidimensionales, geles y membranas, nos permitió localizar en los geles la mayor parte de los spots que contenían proteínas fijadoras de plasminógeno. De esta forma seleccionamos y cortamos, para el análisis por espectrometría de masas, 30 spots: 16 se cortaron de los geles 2D de rango de pH 5-8 (Fig. 32A) y los 14 restantes de los geles 7-10 (Fig. 32B).

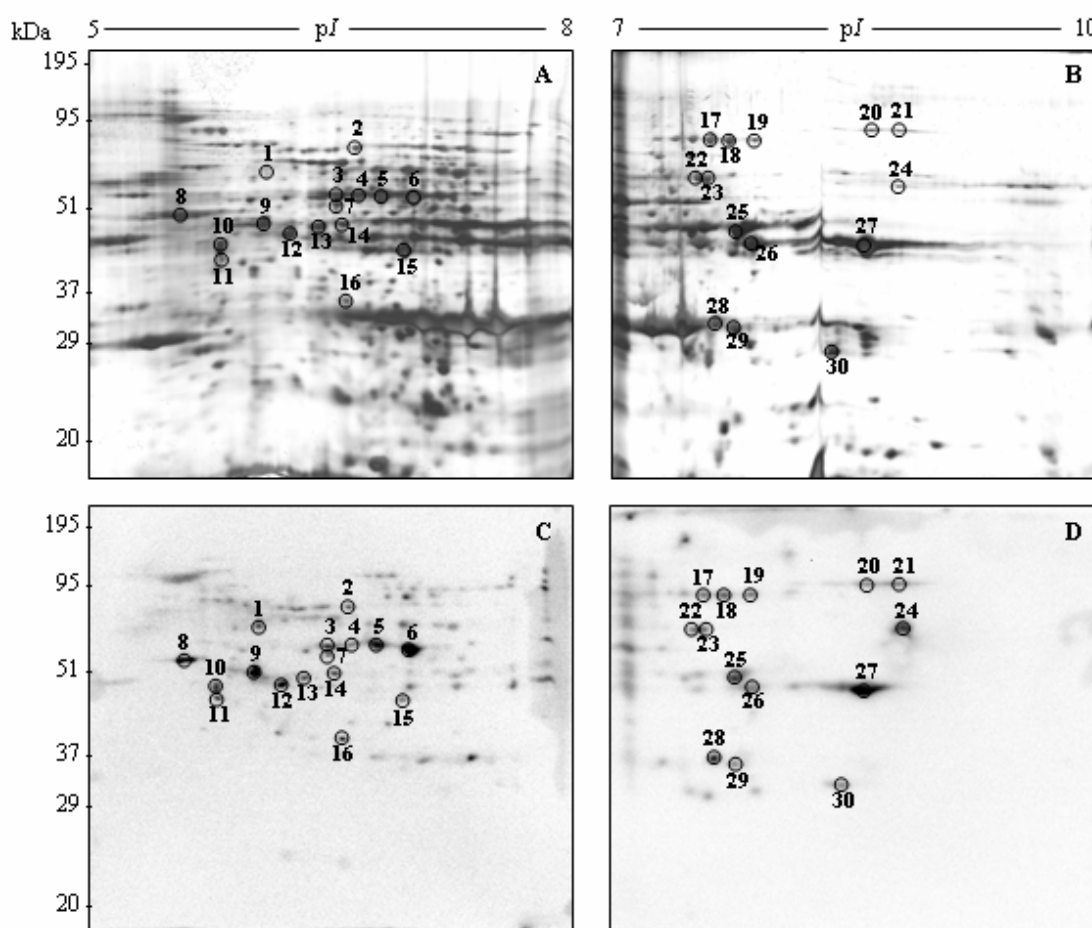


Figura 32. Blotting 2D de fijación de plasminógeno a las proteínas del extracto TG. (A y B), Geles 2D de rango de pH 5-8 y 7-10 y 12% de acrilamida teñidos con plata. (C y D), Spots fijadores de plasminógeno revelados en los blots correspondientes. Los números y círculos indican los spots analizados por espectrometría de masas.

De los 30 spots analizados se identificaron 24, que correspondieron a 10 proteínas (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación mediante MALDI-TOF de las proteínas fijadoras de plasminógeno presentes en el extracto TG.

Spot	Proteína	Especie	Nº acceso. (NCBI)	PM (kDa) Teor./exp.	pI Teor./exp.	% de secuencia	MASCOT score
1	Hipotética ^a	<i>S. japonicum</i>	AAW24823	60/68	6.8/6.3	4	120
3	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/56	6.2/6.7	22	90
4	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/56	6.2/6.8	14	97
5	Enolasa	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/56	6.2/6.9	16	86
6	Enolasa	<i>S. japonicum</i>	P33676	48/56	6.2/7.1	24	125
7	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/52	6.2/6.7	12	103
8	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/50	5.5/5.9	29	172
9	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/48	5.5/6.3	29	152
10	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/45	5.5/6.1	23	95
11	Enolasa ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/42	6.2/6.1	9	132
12	Actina	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/46	5.5/6.4	18	113
13	Enolasa ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.6	-	61
14	Enolasa ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.7	-	82
15	GAPDH ^b	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/43	7.7/7.1	-	107
16	Hipotética ^a	<i>S. japonicum</i>	AAP06049	33/36	6.5/6.8	12	97
17	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/82	8.1/7.7	19	120
18	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/82	8.1/7.8	34	208
19	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/82	8.1/7.9	12	112
25	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.8	49	225
26	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.9	21	90
27	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.6	17	134
28	PGM ^a	<i>S. japonicum</i>	AAL30898	28/32	7.5/7.7	16	128
29	TPI	<i>S. mansoni</i>	A38233	28/32	7.4/7.8	37	163
30	AK ^a	<i>S. mansoni</i>	P25824	23/29	8.8/8.4	35	134

AK, adenilato cinasa; ATPGK, ATP:guanidino cinasa; FbisPA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; TPI, triosa fosfato isomerasa.

^a Spots identificados utilizando los datos PMF en combinación con los datos de MS/MS.

^b Spots identificados únicamente a partir de los datos de MS/MS.

Todas estas proteínas se identificaron por su similitud con proteínas homólogas de otras especies de esquistosoma (*S. mansoni* y *S. japonicum*), y fueron las siguientes: enolasa, actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), ATP: guanidino cinasa (ATPGK), fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FbisPA), fosfoglicerato mutasa (PGM), triosafosfato isomerasa (TPI), adenilato cinasa (AK) y dos proteínas adicionales

similares a dos proteínas hipotéticas de *S. japonicum* (en los spots nº 1 y 16). El spot nº 1 figura en las bases de datos Swiss-Prot/TrEMBL con actividad glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa y es similar a la secuencia de mRNA del clon ZSD114 de *S. japonicum* (nº de registro en GenBank AY223026). Los péptidos del spot nº 16 mostraron homología con la enzima glioxalasa I.

Se identificaron 8 isoformas de enolasa, 4 de actina, 3 de GAPDH y 3 de ATPGK. Del resto de las proteínas sólo se identificó una isoforma.

Los spots que fijaron plasminógeno con más intensidad fueron los correspondientes a las isoformas de actina, enolasa y GAPDH.

Los resultados de este apartado han sido publicados en el siguiente artículo (ver Anexo):

RAMAJO-HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; RAMAJO-MARTÍN, V.; OLEAGA, A. (2007)

Schistosoma bovis: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument.

Experimental Parasitology, 115: 83-91

IV. RESUMEN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN *Schistosoma bovis*.

La tabla 9 muestra todas las proteínas identificadas en *S. bovis* en la presente tesis doctoral. En total se han identificado 24 proteínas, la mayor parte de las cuales presentaban varias isoformas.

De estas proteínas, 6 estaban presentes sólo en el extracto ES, 8 en ambos extractos y 10 sólo en el extracto TG.

De las 14 proteínas identificadas en el extracto ES, 4 eran antigénicas (SMA22.6, Sb28GST, CBendo y serpina), 7 no antigénicas (ATPGK, FbisPA, FABP, SOD, anexina, lisozima y TGR) y 3 (enolasa, GAPDH y SFP) presentaron isoformas antigénicas e isoformas no antigénicas.

De las 18 proteínas identificadas en el extracto TG, 2 eran antigénicas (SMA22.6 y Sb28GST), 13 no antigénicas (ATPGK, FbisPA, similar GP, tubulina, similar rabGDP, similar CT, FABP, SOD, Glc6PDH, glioxalasa, PGM, TPI y AK) y 3 (actina, enolasa y GAPDH) presentaron isoformas antigénicas e isoformas no antigénicas.

De las 24 proteínas identificadas, 8 eran glicoproteínas, como muestra la presencia en ellas de los diversos motivos glicánicos reconocidos por las lectinas y los anticuerpos anti-glicanos. Cuatro de estas glicoproteínas (ATPGK, enolasa, FbisPA y GAPDH) están presentes en ambos extractos, la actina está presente sólo en el extracto TG y las 3 glicoproteínas restantes (SPF, serpina y CBendo) sólo fueron identificadas en el extracto ES.

Por último, 10 proteínas tegumentales mostraron capacidad para unir plasminógeno: enolasa, actina, GAPDH, ATPGK, FbisPA, PGM, TPI, AK, Glc6PDH y glioxalasa.

Tabla 9. Proteínas identificadas en *S. bovis*.

Proteína	Nº de isoformas	Glicanos	Antigénica	Unión a Plasminógeno	TG	ES
ATPGK	4	Fuc α 1-3GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β , LeX, LeY	-	+	+	+
Enolasa	8	Fuc α 1-3GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β	-/+	+	+	+
Actina	6	Fuc α 1-3GlcNAc	-/+	+	+	-
FbisPA	5	Fuc α 1-3GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β	-	+	+	+
GAPDH	7	Fuc α 1-3GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β , LeX, LeY	-/+	+	+	+
Similar GP	3	-	-	-	+	-
α -tubulina	1	-	-	-	+	-
Similar rabGDP	1	-	-	-	+	-
Similar CT	1	-	-	-	+	-
FABP	2	-	-	-	+	+
SOD	1	-	-	-	+	+
SMA22.6	2	-	+	-	+	+
Sb28GST	4	-	+	-	+	+
Glc6PDH	1	-	-	+	+	-
Glioxalasa	1	-	-	+	+	-
PGM	1	-	-	+	+	-
TPI	1	-	-	+	+	-
AK	1	-	-	+	+	-
SPF	9	Fuc α 1-3GlcNAc, Man α (1-3, 6, 2)Man, LDN	-/+	-	-	+
Serpina	3	Man α (1-3, 6, 2)Man, LDN	+	-	-	+
CBendo	2	Fuc α 1-3GlcNAc	+	-	-	+
Anexina	1	-	-	-	-	+
Lisozima	1	-	-	-	-	+
TGR	1	-	-	-	-	+

ATPGK, ATP:guanidino cinasa; FbisPA, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; similar GP, similar a la glucógeno fosforilasa; similar rabGDP, similar al inhibidor de disociación del rabGDP; similar CT, similar al precursor de la citrato sintasa; FABP, proteína unidora de ácidos grasos; SOD, superóxido dismutasa; SMA22.6, antígeno de tegumento; Sb28GST, glutatión S-transferasa de 28 kDa; Glc6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; TPI, triosa fosfato isomerasa; AK, adenilato cinasa; SPF, proteína de superficie del verme; serpina, inhibidor de serina proteasa; CBendo, catepsina B endopeptidasa; TGR, tioredoxina glutatión reductasa.

-/+, existencia de isoformas antigénicas y no antigénicas en una proteína.

DISCUSIÓN

Dado que el objetivo general de la presente tesis doctoral era la caracterización de las moléculas de *S. bovis* implicadas en sus relaciones con el hospedador vertebrado, y dado que dichas moléculas deben estar, necesariamente, entre las que el parásito expone al hospedador durante la infección, en consecuencia el material parasitario objeto de estudio debía contener todas esas moléculas y, en la medida de lo posible nada más que esas para limitar interferencias con moléculas irrelevantes.

Por este motivo, en lugar de obtener extractos completos de vermes adultos, preparamos dos extractos que contenían mayoritariamente a los componentes parasitarios que forman parte de la interfase parásito-hospedador, es decir, a los productos de excreción/secreción (extracto ES) y a las moléculas de la superficie del tegumento (extracto TG) (Loukas et al., 2001).

El estudio de estos dos extractos, en lugar de otros más complejos, no sólo ofrecía la ventaja de limitar su composición a los componentes relevantes en relación con nuestro objetivo, sino también la de que una composición más simple facilita el análisis proteómico (Wilson et al., 2004). No obstante, esta estrategia tuvo como inconvenientes que el procedimiento de preparación de los extractos fue más laborioso y, sobre todo, que la cantidad de proteína obtenida era muy baja, lo cual nos obligó a trabajar en escala analítica (minigeles) y a utilizar sistemas de detección más sensibles, como la tinción de plata y el colorante fluorescente Sypro Ruby (en lugar del Azul Coomassie) y, en ocasiones, los sustratos quimioluminiscentes en lugar del 4-cloro-1-naftol.

Comenzamos analizando los mapas proteómicos de los extractos ES y TG y observamos que dichos mapas proteómicos mostraron bastante similitud entre sí tanto en el número de spots detectados (400-600) como en la distribución de los spots a lo largo de prácticamente los mismos rangos de pI (5-9) y peso molecular (15-200 kDa).

Esta similitud no resultó extraña debido a que el ES contiene, además del vómito del parásito, a los componentes que son desprendidos/liberados a partir del tegumento (Cutts y Wilson, 1997) y, por tanto, era previsible que ambas fracciones compartieran componentes, como de hecho así ocurrió.

A la hora de comparar el número de spots detectados en el ES (400) y en el TG (600) de *S. bovis* con los detectados en compartimentos similares de otras especies de esquistosomas, nos encontramos que únicamente había descritos mapas proteómicos

para el tegumento pero no para el ES. En este sentido, Braschi et al. (2006b) extrajeron secuencialmente tres fracciones de proteínas del tegumento de *S. mansoni* utilizando tres tampones de creciente poder de solubilización. Con estas fracciones, los citados autores obtuvieron tres mapas bidimensionales con 274, 316 y 164 spots respectivamente, lo que, en conjunto, coincide bastante con lo obtenido por nosotros con el TG de *S. bovis*.

También encontramos descritos algunos mapas del proteoma soluble de adultos enteros de *S. mansoni* (Curwen et al., 2004) y mapas de los proteomas soluble e hidrófobo de machos y hembras de *S. japonicum* (Cheng et al., 2005). Teniendo en cuenta que esos proteomas están revelados con plata, que contienen entre 847 y 1288 spots y que proceden de vermes completos, parece razonable pensar que el número de spots que nosotros detectamos en el ES y TG de *S. bovis* es una buena aproximación al número real de componentes en ambos compartimentos proteicos. Un número que, por otra parte, está muy alejado de los 60 spots detectados en el ES de adultos de *Fasciola hepatica* por Jefferies et al. (2001). Esta diferencia es, probablemente, más aparente que real puesto que estos autores utilizaron una tinción menos sensible que la plata, como es el Azul de Coomassie.

De todos los spots separados en el conjunto de ambos extractos se analizaron para su identificación un total de 96 spots. Estos spots fueron elegidos por ser antigénicos (26 en el ES y 20 en el TG) o, no siendo antigénicos, por ser mayoritarios (los 25 spots mayoritarios no antigénicos de cada extracto).

El análisis por espectrometría de masas de los 96 spots, seguido de la búsqueda en las bases de datos, permitió identificar a 64 de ellos, es decir, al 66,6% de los spots analizados; un porcentaje equiparable a los conseguidos por otros investigadores, como por ejemplo: 45-65% para *S. mansoni* (Curwen et al., 2004); 54% para *S. japonicum* (Cheng et al., 2005) y 48% para *Fasciola hepatica* (Jefferies et al., 2001).

Los 64 spots identificados corresponden a 19 proteínas: 18 del parásito y una del hospedador. Todas estas proteínas, excepto la Sb28GST y la FABP, fueron identificadas por su similitud con proteínas homólogas de otras especies de esquistosomas (*S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*). Esto demuestra que, como era previsible, es posible identificar proteínas de *S. bovis* por comparación con las conocidas en otras especies próximas. Por su parte, la Sb28GST y la FABP son dos de las escasas proteínas de *S. bovis* que ya estaban secuenciadas, lo que nos permitió su identificación directa.

En relación con los spots antigénicos detectados en cada extracto llama la atención su baja proporción (sólo el 6 % en el ES y el 4 % en el TG), puesto que en teoría la mayor parte de los componentes de ambos extractos están potencialmente expuestos al sistema inmunitario del hospedador. Por el momento desconocemos el porqué de este fenómeno. La mayor parte de los spots antigénicos analizados pudieron ser identificados (39 de 46 spots, el 85%), lo que ha permitido caracterizar, en el conjunto de los dos extractos, a un total de 8 proteínas antigénicas.

Tres de ellas (la enolasa, la Sb28GST y el antígeno de tegumento de 22,6 kDa) estaban presentes en ambos extractos.

La enolasa es una enzima implicada en la glucólisis y además es una proteína multifuncional que pertenece a una nueva clase de proteínas de superficie que se caracterizan por carecer de la maquinaria clásica para el transporte a la superficie (Pancholi, 2001). En *S. mansoni* se ha identificado enolasa en una fracción soluble del tegumento de vermes adultos (Braschi et al., 2006b) y, en otros helmintos, se ha demostrado la presencia de enolasa en los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (Bernal et al., 2004) y en la mayoría de los tejidos de los adultos de *Onchocerca volvulus* (Jolodar et al., 2003). Acerca de la antigenicidad de las enolasas de los esquistosomas, hasta la fecha la única información al respecto procede de los trabajos de Mutapi et al. (2005, 2008), en los cuales, mediante western blot 2D y espectrometría de masas, identificaron en *S. haematobium* varias isoformas de enolasa que son reconocidas por sueros de personas con esquistosomosis. Por tanto cabe señalar que nuestro hallazgo de enolasas antigénicas en el ES y TG de *S. bovis* es compatible con los datos previos.

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son un grupo de enzimas, presentes en todos los animales, implicadas en la detoxificación y retirada de moléculas potencialmente lesivas para el organismo. Las GSTs de *Schistosoma* sp. tienen dos formas: una de 26 kDa y otra de 28 kDa. La GST de 28 kDa de *S. mansoni* es una proteína antigénica soluble excretada por el parásito y expresada transitoriamente en la superficie del tegumento (Abath y Werkhauser, 1996). Si esto mismo ocurre en *S. bovis*, explicaría fácilmente la presencia de la Sb28GST en el extracto ES y en el TG de esta especie. Por otro lado, diversos trabajos han demostrado el interés vacunal de la Sb28GST frente a la esquistosomosis de rumiantes (Capron et al., 1992; Boulanger et al., 1999).

Por su parte, del antígeno de tegumento de 22,6 kDa se sabe que su homólogo en los esquistosomas de humanos es una proteína asociada al tegumento, aunque aun se

desconoce su función. Esta proteína también muestra potencial valor vacunal ya que en las personas infectadas induce la síntesis de anticuerpos específicos de la clase IgE y el nivel de dichos anticuerpos es directamente proporcional a la resistencia frente a la reinfección tras la quimioterapia (Li et al., 2000; Fitzsimmons et al., 2004). Por otro lado, también se ha observado *in vitro* que los esquistosomas liberan este antígeno al medio (Dunne et al., 1997), lo cual puede explicar su presencia no sólo en el tegumento de *S. bovis* sino también en el extracto ES.

En cuanto a las proteínas antigénicas identificadas únicamente en el extracto ES, éstas fueron la catepsina B endopeptidasa, el inhibidor de serina proteasa (serpina) y la proteína de superficie del verme (SPF). La presencia de estas dos últimas sólo en el ES - y no en el TG- fue inesperada ya que se trata de proteínas asociadas al tegumento (Abath y Werkhauser, 1996).

Las serpinas de los esquistosomas son glicoproteínas antigénicas que participan en los mecanismos de evasión del parásito bloqueando la actividad de la elastasa de los neutrófilos (Blanton et al., 1994; Ghendler et al., 1994).

La proteína identificada en el extracto ES de *S. bovis* como proteína de superficie del verme (SPF) es un antígeno muy abundante en dicho extracto, como muestran los numerosos -aunque poco resueltos- spots en los que se identificó (Fig. 5). Resulta llamativo el amplio rango de pesos moleculares que muestran dichos spots (de 102 a 194 kDa). Dado que se trata de una glicoproteína fuertemente glicosilada (ver más adelante), una explicación para este hecho puede ser que las isoformas presentes en los distintos spots tengan diferente grado de glicosilación y, por tanto, distinto tamaño. Sin embargo, no podemos descartar tampoco cierto grado de degradación proteolítica ya que los spots no antigénicos nº 34 y 35, también identificados en el ES como proteína de superficie del verme, presentan unos pesos moleculares notoriamente inferiores (47 y 53 kDa) al de los spots antigénicos (ver Tablas 1 y 2).

La catepsina B identificada en *S. bovis* muestra homología con la catepsina B2 de *S. mansoni*, la cual se expresa en el tegumento del verme pero no en el intestino (Caffrey et al., 2002). La catepsina de *S. bovis* sólo la hemos identificado en el extracto ES pero no en el TG, lo que coincide mejor con lo descrito para la catepsina B1 de *S. mansoni*, molécula que es secretada por el intestino de los esquistosomas adultos (Sajid et al., 2003). En relación con las catepsinas de los esquistosomas, diversos autores han puesto de manifiesto su potencial valor como dianas para fármacos y también como marcadores diagnósticos de la enfermedad (Caffrey et al., 2002).

Por su parte, las proteínas antigénicas identificadas únicamente en el extracto TG fueron la actina y la GAPDH. La actina es una proteína con múltiples isoformas, producto de genes homólogos muy conservados (Curwen et al., 2004). En el TG hemos identificado 6 isoformas de actina con diferentes pesos moleculares y pIs, de las cuales dos resultaron antigénicas. No existen datos acerca de la antigenicidad de las actinas de *Schistosoma* sp. (Curwen et al., 2004), excepto para una isoforma antigénica de 47 kDa de *S. japonicum* (Zhu et al., 2000). Dicha antigenicidad no es tan extraña teniendo en cuenta que la actina puede quedar expuesta al sistema inmune del hospedador al formar parte de las espinas de la superficie del verme (Jones et al., 2004).

La GAPDH es una enzima glucolítica que también puede desempeñar otras funciones, alguna de las cuales se comentan más adelante en relación con la fijación del plasminógeno. Por otra parte, Waine et al. (1993) sugieren que la presencia de GAPDH en la superficie de los esquistosomas puede proteger al parásito de los radicales libres del oxígeno liberados por los fagocitos. Esta posible función, junto con el hecho de que el nivel de IgG frente a este antígeno es proporcional a la resistencia a la infección (Dessein et al., 1988), sugieren la posible utilidad de la GAPDH como antígeno vacunal. En el presente trabajo hemos identificado, en el TG de *S. bovis*, a 6 isoformas antigénicas de GAPDH con el mismo peso molecular (44 kDa) y un rango de pIs de 7,4-8,6 (Tabla 3) y también otra isoforma de GAPDH no antigénica, con un peso molecular ligeramente inferior (42 kDa) y un pI de 7,1 (Tabla 4). Además, las isoformas antigénicas, pero no la no antigénica, son portadoras de grupos Lewis^X lo cual les confiere posibles funciones adicionales en la regulación de la respuesta inmunitaria del hospedador (ver más adelante).

El análisis de los 25 spots mayoritarios no antigénicos de cada extracto identificó 10 proteínas adicionales, dos de las cuales -la FABP y la SOD- están presentes en los dos extractos.

Las FABPs intervienen en la adquisición de ácidos grasos de la sangre del hospedador vertebrado. Diversos trabajos con las FABPs de *S. mansoni* y *S. japonicum* han demostrado el valor vacunal de estas moléculas (Tendler et al., 1996; Liu et al., 2004). Aunque no hay estudios similares con la FABP de *S. bovis*, creemos que también puede ser un buen candidato vacunal ya que esta molécula tiene una similitud del 98 % y 90 %, respectivamente, con sus homólogas en *S. mansoni* y *S. japonicum*.

La SOD es una enzima antioxidante implicada en la neutralización de las especies tóxicas del oxígeno producidas por la respuesta inmune del hospedador, lo que la dota de potencial valor como antígeno vacunal (Mei y LoVerde, 1997).

Respecto a las proteínas mayoritarias no antigénicas específicas del extracto ES, hemos identificado 3: la TGR, una lisozima y una proteína similar a la anexina A13.

La TGR es una enzima antioxidante cuya inhibición según Salinas et al. (2004) puede comprometer la supervivencia del parásito, lo que la convierte en una molécula de interés vacunal o una posible diana para fármacos.

En relación con la lisozima, que nosotros sepamos, es la primera vez que se identifica en esquistosomas. Por su tamaño y pI esta lisozima es más parecida a las lisozimas con funciones digestivas de los invertebrados que a las lisozimas que desempeñan funciones antimicrobianas en estos mismos organismos (Grunclová et al., 2003).

Las anexinas son una familia de proteínas escasamente estudiadas en *Schistosoma*. El estudio en profundidad de estas proteínas en los esquistosomas puede ser de gran interés dadas las funciones descritas para algunas anexinas de otros organismos (anticoagulante, antiinflamatoria, profibrinolítica) (Hayes y Moss, 2004; Moss y Morgan, 2004); funciones que podrían ser de gran utilidad para la supervivencia de estos parásitos en sus hospedadores.

En relación con las proteínas mayoritarias no antigénicas específicas del extracto TG hemos identificado cinco. Tres de ellas (la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, una proteína similar al precursor de la citrato sintasa y una proteína similar a la glucógeno fosforilasa) intervienen en procesos metabólicos tales como la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el metabolismo de carbohidratos. Las dos proteínas restantes son la α -tubulina, que es una proteína estructural, y una proteína hipotética similar al inhibidor de la disociación del rab GDP, que participa en procesos de transporte en membranas de células eucariotas (Rak et al., 2003).

Tras analizar los mapas proteómicos de los extractos ES y TG y una vez identificadas sus proteínas antigénicas y las mayoritarias no antigénicas, nuestro siguiente objetivo fue la caracterización de los glicanos presentes en estos extractos y la identificación de las glicoproteínas portadoras de dichos glicanos.

Para ello comenzamos analizando la reactividad de ambos extractos frente a un conjunto de lectinas de distinta especificidad mediante un sencillo blotting

monodimensional. Este ensayo proporcionó una información básica acerca del tipo de motivo glicánico terminal presente o ausente en las glicoproteínas del ES y el TG (Fig. 11 y 15), que nos sirvió de guía en el posterior análisis mediante blotting bidimensional.

Como era de esperar, dada la ausencia de ácido siálico en las otras especies de *Schistosoma* (Nyame et al., 1998), este ensayo confirmó la ausencia de ácido siálico en las glicoproteínas de *S. bovis* (Fig. 11 y 15), o al menos en las presentes en los extractos ES y TG.

Este ensayo también mostró que las glicoproteínas del ES y el TG de *S. bovis* carecían de los motivos glicánicos reconocidos por las lectinas PNA (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr) y DSA (LacNAc, GlcNAc-Ser/Thr) (Fig. 11 y 15). La ausencia de estos motivos en las glicoproteínas del ES y el TG de los vermes adultos no descarta, sin embargo, su presencia en otras partes del cuerpo del verme o incluso en otras fases evolutivas de *S. bovis*. De hecho, se han detectado O-glicanos simples como los reconocidos por PNA (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr) y DSA (GlcNAc-Ser/Thr) en homogenados completos de vermes adultos y de esquistosómulas de *S. mansoni* (Nyame et al., 1987, 1988a). También se han descrito O-glicanos más complejos terminados en GlcNAc o LacNAc (ambos unidores de DSA) en el glicocáliz de las cercarias de *S. mansoni* (Huang et al., 2001).

La lectina GNA no reconoció ninguna glicoproteína en el extracto TG (Fig. 15), pero sí reconoció dos en el ES (Fig. 11), que fueron posteriormente identificadas como proteína de superficie del verme (SPF) e inhibidor de serina proteasa (serpina) (Fig. 13 y Tabla 5).

La unión con la lectina GNA indica la presencia de residuos terminales de manosa. Estos residuos forman parte de N-glicanos de tipo híbrido, truncado o de alta manosa. En consecuencia, cabe suponer que la SPF y la serpina de *S. bovis* son portadoras de este tipo de N-glicanos. En todas las células eucariotas el núcleo básico de los N-glicanos es la quitobiosa (Man₃GlcNAc₂); además, en invertebrados y en plantas pero no en mamíferos, este núcleo puede estar modificado individual o simultáneamente con una xilosa y/o una o dos fucosas, formando otros núcleos N-glicánicos denominados fucosa α 3 (α 3-Fuc), fucosa α 6 (α 6-Fuc) y xilosa β 2 (β 2-Xyl) (Jang-Lee et al., 2007). Faveeuw et al. (2003) detectaron N-glicanos del tipo híbrido en los productos de excreción-secreción de esquistosómulas, adultos y huevos de *S. mansoni*, en los cuales el núcleo de quitobiosa estaba sustituido parcialmente formando núcleos β 2-Xyl

y α 3-Fuc. Estos mismos autores también comprobaron que estos N-glicanos eran muy antigénicos y que inducían intensas respuestas inmunitarias de tipo Th2. Dado que las glicoproteínas SPF y serpina de *S. bovis* son también muy antigénicas (ver Tabla 1 y Fig. 4), y además muy abundantes en el extracto ES, es razonable suponer que los N-glicanos de estas proteínas son del tipo híbrido, similares a los descritos para *S. mansoni*. Evidentemente, la demostración de esta hipótesis requerirá un análisis estructural detallado de estos carbohidratos.

Tal como se ha mencionado previamente, llama la atención el amplio rango de pesos moleculares que muestran las isoformas de la glicoproteína SPF (las reconocidas por GNA oscilan entre 47 y 191 kDa, ver Tabla 5). Aunque no podemos descartar categóricamente que cierto grado de degradación proteolítica contribuya a estas diferencias en el peso molecular -a pesar de haber utilizado inhibidores de proteasas durante la preparación de los extractos-, pensamos, sin embargo, que una mejor explicación para este fenómeno es que dichas isoformas presenten diferencias en el grado y tipo de glicosilación. De hecho, mientras que todas las isoformas de SPF fueron reconocidas por la lectina GNA, únicamente las de mayor peso molecular (de 123 a 191 kDa) fueron también reconocidas por las lectinas WFA y LTA (Tabla 5), indicando la presencia de grupos glicánicos adicionales que pueden ser la causa del incremento en el peso molecular de estas isoformas.

La lectina WFA no reconoció a ninguna glicoproteína en el extracto TG, y en el extracto ES reconoció únicamente a las isoformas de alto peso molecular de la SPF y a las tres isoformas identificadas de serpina. La reacción con la lectina WFA indica que estas dos glicoproteínas de *S. bovis* son portadoras del motivo LDN (GalNAc β 1-4GlcNAc β 1). El LDN es un motivo antigénico expresado abundantemente por los esquistosomas, pero también por humanos y probablemente por otros mamíferos (Hokke y Yazdanbakhsh, 2005). En *S. mansoni*, el motivo LDN es expresado por las cercarias, esquistosómulas y adultos en la superficie tegumental y también por los huevos del parásito tanto en su cubierta como en sus secreciones (Nyame et al., 2003). Curiosamente, nosotros hemos detectado el LDN sólo en las secreciones de los adultos, pero conjugado con dos glicoproteínas, SPF y serpina, que normalmente son expresadas como parte del tegumento (Abath y Werkhauser, 1996). La presencia de estas dos glicoproteínas en el extracto ES puede explicarse fácilmente debido a que, como ya se ha mencionado, durante la preparación de dicho extracto resulta habitual la liberación al

mismo de determinados componentes del tegumento (Cutts y Wilson, 1997). Lo que ya no tiene una explicación tan evidente es la ausencia total de ambas glicoproteínas en el extracto TG (Tablas 3 y 6).

Por su parte, la lectina LTA reconoce específicamente al motivo $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3\text{GlcNAc}$, el cual forma parte de varios glicanos abundantemente expresados en las glicoproteínas de los esquistosomas. Estos glicanos son los grupos LDN-F, F-LDN-F y Lewis^X (Nyame et al., 2003; Robijn et al., 2005). Otros glicanos que también contienen al motivo reconocido por la LTA son el Lewis^Y ($\text{Fuc}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}\beta 1\text{-}4(\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3)\text{GlcNAc}\beta 1$) y el pseudo-Lewis^Y ($\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4(\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3)\text{GlcNAc}\beta 1$). De estos dos glicanos, sólo el pseudo-Lewis^Y ha sido detectado en los esquistosomas, en concreto en los glicolípidos de las cercarias de *S. mansoni* (Wuhrer et al., 2000; Meyer et al., 2005). Por su parte, el glicano Lewis^Y nunca se ha encontrado en el género *Schistosoma* sp. a pesar de haber sido buscado específicamente, al menos en los esquistosomas de humanos (Nyame et al., 1998).

Teniendo en cuenta el amplio rango de glicanos que se pueden unir a la lectina LTA y el hecho de que muchos de estos glicanos están presentes en las glicoproteínas de los esquistosomas, no nos sorprendieron ni el elevado número de bandas reveladas por la LTA en los blottings 1D (Fig. 10 y 15), ni la elevada proporción de spots reconocidos por esta lectina en ambos extractos: el 42,5 % en el ES (Fig. 12) y el 28 % en el TG (Fig. 17). De hecho, todas las glicoproteínas identificadas en *S. bovis* en el presente trabajo, excepto la serpina y las isoformas de bajo peso molecular de la SPF, fueron reconocidas por LTA (Tablas 5 y 6), lo que indica que dichas glicoproteínas están intensamente fucosiladas en posiciones $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3\text{GlcNAc}$. Estas glicoproteínas fucosiladas unidoras de LTA resultaron ser siete: SPF, ATP guanidino cinasa (ATPGK), enolasa, fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa (FbisPA), GAPDH, catepsina B endopeptidasa (CBEndo) y actina. Todas ellas, excepto SPF, CBEndo (solo en el ES) y la actina (solo en el TG), estaban presentes en ambos extractos (Tablas 5 y 6).

En relación con la antigenicidad de estas glicoproteínas unidoras de LTA, resultó que no todas ellas eran antigénicas, puesto que, como habíamos visto en la primera parte de la tesis, sólo las isoformas de alto peso molecular de la SPF, la enolasa, la GAPDH y la CBEndo fueron antigénicas (Tablas 1 y 3). Esto sugiere que no existe una relación directa entre la presencia del motivo $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3\text{GlcNAc}$ en las glicoproteínas de *S. bovis* y la antigenicidad de dichas glicoproteínas. De hecho, los glicanos

fucosilados que contienen únicamente este motivo fucosilado, tales como LDN-F y Lewis^X, generalmente inducen respuestas humorales débiles, aunque pueden tener efectos inmunomoduladores (Robijn et al., 2005). Curiosamente, glicanos similares, tales como los F-LDN(-F) y (DF-)LDN-DF, que contienen otros motivos fucosilados (Fuc α 1-3GalNAc β 1- o Fuc α 1-2Fuc α 1-), inducen fuertes respuestas humorales, al menos en la infecciones humanas y de otros primates (Van Remoortere et al., 2003; Robijn et al., 2005; Wuhler et al., 2006).

Teniendo esto en cuenta, quisimos profundizar un poco más en el análisis de las glicoproteínas fucosiladas de los extractos ES y TG de *S. bovis* comprobando si dichas glicoproteínas eran portadoras de los glicanos F-LDN(-F) y Lewis^X. Además, puesto que el glicano Lewis^Y también contiene el motivo Fuc α 1-3GlcNAc, reconocido por la lectina LTA, también analizamos la presencia de Lewis^Y en dichas glicoproteínas.

Para ello utilizamos como sondas, respectivamente, un anticuerpo policlonal anti-KLH y sendos anticuerpos monoclonales anti-Le^X y anti-Le^Y. Es bien conocido que la molécula KLH (Keyhole limpet haemocyanin) y los esquistosomas comparten los antígenos glicánicos F-LDN(-F) (Geyer et al., 2005), motivo por el cual puede utilizarse un anticuerpo policlonal anti-KLH como sonda para la búsqueda en *S. bovis* de los glicanos que contienen el grupo F-LDN(-F).

Pues bien, los análisis por western blot monodimensional de los extractos ES y TG con el anticuerpo anti-KLH mostraron claramente la ausencia de epítomos F-LDN(-F) en las glicoproteínas de estos extractos (Fig. 19). Este anticuerpo, sin embargo, sí reconoció numerosas bandas en los extractos solubles (aunque no en los insolubles) de huevos y cercarias de *S. bovis* (Fig. 22B). Estos resultados indican que *S. bovis* expresa los antígenos F-LDN(-F) en las glicoproteínas de los huevos y las cercarias pero no en las de los vermes adultos, lo cual coincide con lo descrito por Robijn et al. (2005) para las glicoproteínas de *S. mansoni*. En este mismo trabajo, los autores también comprobaron que *S. mansoni* expresa los antígenos F-LDN(-F) en los glicolípidos de las cercarias, adultos y huevos. Según esto, es posible que *S. bovis* también exprese los antígenos F-LDN(-F) formando parte de sus glicolípidos.

En cualquier caso, junto con los resultados del western blot, la intensa respuesta de anticuerpos del tipo IgG e IgM frente a KLH, observada en todos los corderos infectados con *S. bovis*, corrobora la expresión de los antígenos F-LDN(-F), al menos, en las glicoproteínas de los huevos y las cercarias (Fig. 25).

En la búsqueda de las glicoproteínas portadoras de antígenos Lewis^X y Lewis^Y en los extractos ES y TG obtuvimos algunos resultados interesantes que conviene comentar (Fig. 20, 21 y Tabla 7).

En primer lugar, detectamos el antígeno Lewis^X en varias glicoproteínas de *S. bovis*. Este hallazgo era previsible en vista de que el antígeno Lewis^X es abundantemente expresado por otras especies de *Schistosoma* sp. (Nyame et al., 1998; Hokke y Yazdanbakhsh, 2005). Curiosamente, también detectamos el antígeno Lewis^Y en las mismas glicoproteínas de *S. bovis*, un hallazgo que no era previsible ya que este glicano nunca se había encontrado en el género *Schistosoma* y, además, Nyame et al. (1998) habían demostrado fehacientemente la ausencia de Lewis^Y y de otros antígenos Lewis, como el Lewis^b (Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1) y el Lewis^a (Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1), en las tres especies principales que infectan a humanos: *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*.

En segundo lugar, encontramos ambos antígenos, Lewis^X y Lewis^Y, únicamente en el extracto TG y no en el extracto ES. Este hecho coincide con la observación de que en otros esquistosomas el grupo Lewis^X se expresa en la superficie del tegumento pero no en las secreciones, excepto en la fase de huevo (Nyame et al., 2003; Hokke et al., 2007b). No obstante, encontramos a ambos antígenos Lewis en dos glicoproteínas, la ATPGK y la GAPDH, que presentaban isoformas tanto en el extracto ES como en el TG. Dado que los monoclonales anti-Lewis^X y anti-Lewis^Y no detectaron nada en el extracto ES, esto que sugiere que las isoformas secretadas de estas dos proteínas no contienen dichos grupos Lewis.

Y en tercer lugar, observamos que los dos anticuerpos monoclonales anti-Lewis^X y anti-Lewis^Y reconocieron en el extracto TG exactamente las mismas isoformas de ATPGK y GAPDH (Fig. 21, Tabla 7). Este hecho, junto con la ausencia demostrada del antígeno Lewis^Y en las especies de esquistosomas de humanos, parecía sugerir que el hallazgo de Lewis^Y en glicoproteínas de *S. bovis* podría ser un artefacto provocado por una hipotética reactividad cruzada entre ambos anticuerpos monoclonales, de forma que el monoclonal anti-Lewis^Y pudiera estar reconociendo al antígeno Lewis^X. Sin embargo, descartamos inmediatamente esta posibilidad porque ambos antígenos son bastante diferentes y, sobre todo, porque mediante un sencillo ELISA cruzado con las neoglicoproteínas LNFPIII-BSA y Le^Y-hexasacárido-BSA verificamos que no existía, en absoluto, reactividad cruzada entre ambos monoclonales (ver apartado III.5. de Materiales y Métodos). Consecuentemente la presencia de Lewis^Y en estas dos

glicoproteínas de *S. bovis* parecía ser real. Este hecho se vio confirmado tras detectar en todos los corderos infectados con *S. bovis* respuestas humorales específicas, frente a cada uno de estos dos antígenos Lewis, que presentaban entre sí claras diferencias en su intensidad y cinética (Fig. 26 y 27). En conjunto, estos resultados indican que ambos antígenos, Lewis^X y Lewis^Y, son co-expresados en las mismas isoformas de ATPGK y GAPDH por los vermes adultos de *S. bovis*, aunque la demostración inequívoca de este hallazgo requerirá un análisis estructural detallado por espectrometría de masas.

Finalmente, cabe señalar que el patrón de spots revelados por la lectina UEA-I en el extracto TG también indica que *S. bovis* expresa realmente estos dos antígenos Lewis. Como se puede ver en las Fig. 18 y 21, la UEA-I reconoció en el extracto TG a las mismas isoformas de ATPGK y GAPDH que el anticuerpo anti-Lewis^Y, lo que indica que dichas isoformas son portadoras del motivo Fuc α 1-2Gal β 1, el cual a su vez forma parte del antígeno Lewis^Y.

Desconocemos el significado biológico de estos hechos, si bien, algunos datos recientemente publicados en relación con los antígenos Lewis pueden proporcionar algunas claves. Se ha demostrado que los antígenos Le^X, Le^a, Le^b y Le^Y se unen a la lectina DC-SIGN del hospedador a través del aminoácido Val351 (ver Meyer et al., 2005). También se ha visto que la lectina DC-SIGN se une al pseudo-Le^Y, un antígeno glicánico que hasta la fecha sólo se ha encontrado en los esquistosomas, en concreto en glicolípidos de cercarias de *S. mansoni* (ver Meyer et al., 2005). La DC-SIGN es una lectina de tipo C (dependiente de Ca²⁺) que se expresa en la superficie de las células dendríticas y que, junto con los receptores Toll-like, modula la inducción de tolerancia o de inmunidad frente a un antígeno determinado. Pues bien, se piensa que los esquistosomas podrían usar sus antígenos Le^X y pseudo-Le^Y para modular la función de las células dendríticas induciendo estados de tolerancia inmunológica en todas las fases de la infección (Meyer et al., loc. cit). Es posible, por tanto, que esta hipótesis pueda ser extrapolada a los antígenos Le^X y Le^Y expresados por *S. bovis*.

Y pasando ya al tercer objetivo de la presente tesis, es un hecho que los esquistosomas adultos viven durante años en los vasos sanguíneos del hospedador. Resulta obvio que en este hábitat intra-vascular, además de con el sistema inmune, el parásito también está en contacto con los componentes del sistema hemostático del hospedador y en consecuencia ha tenido que desarrollar mecanismos para evadir las

respuestas hemostáticas, entre ellas la coagulación sanguínea, puesto que, de hecho, no se forman coágulos en torno a los vermes.

Sin descartar la posible existencia de moléculas anticoagulantes en los esquistosomas, como la ya conocida Sm22 de *S. mansoni* (Lin y He, 2006), otro mecanismo que podría prevenir la formación de coágulos en la superficie de los vermes sería la activación del sistema fibrinolítico del hospedador, mediante la expresión en su superficie tegumental de receptores proteicos capaces de ligar y activar al plasminógeno, generando plasmina.

Esta posibilidad nunca ha sido estudiada en estos parásitos y, consecuentemente, nuestro tercer objetivo fue examinar si en el tegumento de los vermes adultos de *S. bovis* se expresan proteínas ligadoras y activadoras de plasminógeno y, en tal caso, identificar dichas proteínas.

Para llevar a cabo este análisis utilizamos vermes adultos intactos y también el extracto TG, puesto que contiene las proteínas expresadas por los adultos en su superficie tegumental, entre las cuales, necesariamente, deben estar los hipotéticos receptores de plasminógeno.

En este estudio demostramos, en primer lugar, por ELISA y blotting monodimensional, que en el extracto TG existen proteínas capaces de unirse al plasminógeno (Fig. 28 y 29). También demostramos que dicha unión es completamente inhibida por un análogo de lisina como el ϵ -ACA (Fig. 28 y 31), lo que indica que la unión al plasminógeno tiene lugar a través de residuos de lisina de la proteína ligando, tal como se ha visto que ocurre también en algunos hongos, bacterias, protozoos y células humanas (Boyle y Lottenberg, 1997; Avilan et al., 2000; Crowe et al., 2003; Almeida et al., 2004; Rojas et al., 2008).

Acto seguido comprobamos que el extracto TG, además de unirse al plasminógeno, también era capaz de potenciar la generación de plasmina inducida por activadores fisiológicos del plasminógeno, como el activador tisular de plasminógeno (t-PA) (Fig. 30), de una forma similar a la observado en otros parásitos tales como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* (Avilan et al., 2000; Almeida et al., 2004). Igualmente, comprobamos que el extracto TG tenía también capacidad para activar al plasminógeno y generar plasmina por sí mismo, en ausencia de t-PA (Fig. 30).

A la vista de estos datos resultaba obvio que *S. bovis* expresa en su tegumento proteínas capaces de ligar y activar plasminógeno. Pero para que esta fijación y activación del plasminógeno puedan llevarse a cabo en condiciones fisiológicas es necesario que las proteínas tegumentales implicadas estén expuestas en la superficie del verme, en contacto directo con la sangre.

Los ensayos de inmunofluorescencia y el análisis por microscopía confocal demostraron que, efectivamente, el plasminógeno se unía a la superficie del tegumento y que la interacción plasminógeno-receptor estaba mediada por residuos de lisina (Fig. 31). De forma destacada, estos ensayos también demostraron que la fijación de plasminógeno tenía lugar únicamente sobre el tegumento de los machos y no sobre el de las hembras (Fig. 31). El hecho de que las hembras de *S. bovis* no unan plasminógeno en su superficie puede explicarse teniendo en cuenta que la hembra vive alojada en el interior del canal ginecóforo del macho y es posible que no necesite desarrollar mecanismos para prevenir la formación de coágulos en su superficie, al menos en la misma medida que los machos, los cuales están en contacto permanente con los componentes de la sangre del hospedador.

Una vez comprobado que los adultos de *S. bovis* fijan plasminógeno en la superficie de su tegumento nuestro siguiente paso fue tratar de identificar a las proteínas unidoras de plasminógeno. Para ello analizamos el extracto TG por blotting bidimensional y espectrometría de masas, y conseguimos identificar en dicho extracto 10 proteínas fijadoras de plasminógeno, entre las cuales suponemos que se encuentran los receptores fisiológicos.

Los spots más intensamente revelados en los blotting 2D de plasminógeno correspondieron a varias isoformas de enolasa, GAPDH y actina (Fig. 32 y Tabla 8).

De estas proteínas, la que está mejor caracterizada como receptor de plasminógeno es la enolasa. Como ya se ha mencionado, la enolasa es una enzima glucolítica multifuncional (Pancholi, 2001), la cual ha sido descrita en la superficie de varios patógenos como proteína fijadora de plasminógeno. Se ha demostrado que la interacción de esta enolasa superficial con el plasminógeno genera actividad fibrinolítica y facilita la infección del hospedador favoreciendo la diseminación de determinados patógenos por su organismo (Bergmann et al., 2001; Jong et al., 2003). Se ha encontrado enolasa en la superficie de los promastigotes de *L. mexicana* y de *T.*

vaginalis y se ha demostrado que es la molécula que actúa como receptor del plasminógeno (Vanegas et al., 2007; Mundodi et al., 2008). En helmintos se ha identificado enolasa en los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* y en varios tejidos de *Onchocerca volvulus* y se ha visto que la enolasa de ambos helmintos tiene capacidad para unir plasminógeno, si bien no se ha estudiado la trascendencia biológica de dicha interacción (Jolodar et al., 2003; Bernal et al., 2004). En *S. bovis* hemos identificado hasta 8 isoformas de enolasa con capacidad para unir plasminógeno, de las cuales, 4 con el mismo peso molecular y diferente pI, fueron reconocidas por los sueros de los corderos infectados con *S. bovis* y las otras 4, con diferentes pesos moleculares y pIs, no eran antigénicas.

La GAPDH está descrita como una de las principales proteínas fijadoras de plasminógeno en la superficie de células bacterianas y fúngicas (Crowe et al., 2003; Bergmann et al., 2004) y en helmintos también se ha visto que la forma recombinante de la GAPDH de *O. volvulus* une plasminógeno (Erttmann et al., 2005). En el tegumento de *S. bovis* hemos identificado 3 isoformas de GAPDH unidoras de plasminógeno, de las cuales únicamente dos fueron antigénicas.

La actina es una de las proteínas celulares más abundantes, se encuentra en todas las células eucariotas y se sabe desde hace tiempo que une plasminógeno y acelera la generación de plasmina inducida por el t-PA (Lind y Smith, 1991). En *S. bovis*, hemos detectado 4 isoformas de actina fijadoras de plasminógeno, ninguna de las cuales era antigénica.

Esta multiplicidad de isoformas de enolasa, GAPDH y actina, parte de las cuales son antigénicas y otras no, sugiere que *S. bovis* podría utilizar paralogos de enzimas esenciales cuando son reconocidas por el sistema inmune, con el fin de evitar la pérdida de función, tal y como parece ser que ocurre en *S. mansoni* (Verjovski-Almeida et al. 2003).

Además de estas tres proteínas, otras proteínas identificadas en el tegumento con capacidad para unir el plasminógeno fueron ATPGK, triosa-fosfato isomerasa, adenilato cinasa, fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa y fosfoglicerato mutasa. Las dos últimas también han sido identificadas en la pared de *Candida albicans*, donde fijan plasminógeno y potencian su activación (Crowe et al., 2003). En relación con el resto de las proteínas es la primera vez que se demuestra su capacidad para fijar plasminógeno y por el momento se desconoce si además de fijarlo pueden inducir y/o potenciar su activación.

En resumen, estos resultados aportan los primeros datos existentes acerca de la interacción entre el sistema fibrinolítico del hospedador y una especie del género *Schistosoma*, y muestran: (i) que el plasminógeno se une a la superficie externa de los machos de *S. bovis*; (ii) que en el tegumento de este parásito hay proteínas fijadoras de plasminógeno con capacidad para iniciar la generación de plasmina y potenciar la activación inducida por el t-PA y (iii) la identidad de un grupo de proteínas tegumentales entre las que previsiblemente se encuentran los receptores fisiológicos del plasminógeno *in vivo*, para lo cual es necesario que estos se expresen en la superficie externa del tegumento. En consecuencia, se requieren estudios adicionales que determinen cual de estas proteínas está expuesta a la sangre del hospedador y establezcan la función fisiológica de su interacción con el plasminógeno.

CONCLUSIONES

1. Los proteomas de los productos de excreción-secreción y del extracto de tegumento de *Schistosoma bovis* son muy similares entre sí tanto en el número de spots como en los pIs y pesos moleculares de dichos spots. Esta similitud es lógica teniendo en cuenta que los productos de excreción-secreción contienen, además del vómito del parásito, a los componentes desprendidos del tegumento.
2. La proporción de spots antigénicos del extracto TG (4%) y del extracto ES (6%) es baja teniendo en cuenta que la mayor parte de los componentes de ambos extractos, y especialmente los del ES, están potencialmente expuestos al sistema inmune del hospedador.
3. En conjunto, se han identificado 24 proteínas localizadas en la interfase parásito-hospedador, de las cuales 22 no se habían identificado antes en *Schistosoma bovis* y una de ellas, la lisozima, es la primera vez que se identifica en una especie de esquistosoma.
4. Se han identificado 8 glicoproteínas en los extractos ES y TG. El estudio de los glicanos de dichas glicoproteínas demuestra la ausencia de ácido siálico y del motivo FLDN(-F). Se demuestra también la presencia de manosa terminal y de motivos LDN en los N-glicanos del extracto ES, la presencia del motivo Fuc α 1-2Gal β en numerosas glicoproteínas del extracto TG y, así mismo, la presencia del motivo Fuc α 1-3GlcNAc en numerosas glicoproteínas de ambos extractos.
5. *S. bovis* co-expresa los antígenos Lewis^X y Lewis^Y en varias isoformas de dos proteínas del tegumento, la ATP:guanidino cinasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Es la primera vez que se identifica al antígeno Lewis^Y en una especie de esquistosoma.
6. Se comprueba por primera vez que una especie del género *Schistosoma* interactúa con el sistema fibrinolítico del hospedador vertebrado mediante la fijación y activación del plasminógeno en la superficie del verme.

7. Se identifican 10 proteínas tegumentales de *S. bovis* entre las que previsiblemente se encuentran los receptores fisiológicos del plasminógeno *in vivo*, para lo cual es necesario que estos se expresen en la superficie externa del tegumento en contacto con la sangre del hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, I., King, C.H., Sturrock, R.F., Kariuki, C., Muchiri, E. & Hamburger, J. (2007). Differentiation of *Schistosoma haematobium* from related schistosomes by PCR amplifying an inter-repeat sequence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76**: 950-955
- Abath, F.G. & Werkhauser, R.C. (1996). The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. **Parasite Immunology**, **18**: 15-20
- Agnew, A.M., Murare, H.M., Lucas, S.B. & Doenhoff, M.J. (1989). *Schistosoma bovis* as an analogue of *S. haematobium*. **Parasite Immunology**, **11**: 329-340
- Almeida, L., Vanegas, G., Calcagno, M., Concepción, J.L. & Avilan, L. (2004). Plasminogen interaction with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 63-67
- Attwood, S.W., Panasoponkul, C., Upatham, E.S., Meng, X.H. & Southgate, V.R. (2002). *Schistosoma ovuncatum* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from northwest Thailand and the historical biogeography of Southeast Asian *Schistosoma* Weinland, 1858. **Systematic Parasitology**, **51**:1-19
- Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A.B. & Capron, A. (1985). Regulatory role of a tripeptide (TPK) from the second constant domain of immunoglobulin G.I. Inhibition of rat and human macrophage activities. **International Journal of Immunopharmacology**, **7**: 73-79
- Avilan, L., Calcagno, M., Figuera, M., Lemus, L., Puig, J. & Rodriguez, A.M. (2000). Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen-plasmin system. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **110**: 183-193
- Belo, S., Gracio, M.A.A., Ramajo, V. & Oleaga, A. (2002). Usefulness of a 22 kDa *Schistosoma bovis* antigen for the diagnosis of *S. intercalatum* infection. **Proceeding of the Third European Congress on Tropical Medicine and International Health, Lisboa. (Portugal), 2002**

- Benex, J. (1960). Méthode pratique de récolte d'oënts de *Schistosomes* par digestion enzymatique. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses filiales**, **53**: 309-314
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S. (2001). α - Enolasa of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Molecular Microbiology**, **40**: 1273-1287
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S. (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, **49**: 411-423
- Bergmann, S., Rohde, M. & Hammerschmidt, S. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. **Infection and Immunity**, **72**: 2416-2419
- Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S. & Marcilla, A. (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. **FEBS Letters**, **563**: 203-206
- Blanton, R. E., Licate, L. S. & Aman, R. A. (1994). Characterization of a native and recombinant *Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor gene product. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **63**: 1-11
- Boulanger, D., Schneider, D., Chippaux, J.P., Sellin, B. & Capron, A. (1999). *Schistosoma bovis*: vaccine effects of a recombinant homologous glutathione S-transferase in sheep. **International Journal for Parasitology**, **29**: 415-418
- Boyle, M.D.P. & Lottenberg, R. (1997). Plasminogen activation by invasive human pathogens. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 1-10
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Chemistry**, **72**: 248-254

- Brady, C.P., Brindley, P.J., Dowd, A.J. & Dalton J.P. (2000). *Schistosoma mansoni*: differential expression of cathepsins L1 and L2 suggests discrete biological functions for each enzyme. **Experimental Parasitology**, **94**: 75-83
- Braschi, S. & Wilson, R.A. (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Molecular & Cellular Proteomics**, **5**: 347-356
- Braschi, S., Borges, W.C. & Wilson, R.A. (2006a). Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **1**: 205-12
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D. Verjovski-Almeida, S. & Wilson, A. (2006b). The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, **6**: 1471-1482
- Brumpt, E. (1930). Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*. Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. **Annales de Parasitologie**, **8**: 17-50
- Bushara, H.O., Hussein, M.F., Saad, A.M., Taylor, M.G., Dargie, J.D., Marshall, T.F. & Nelson, G.S. (1978). Immunization of calves against *Schistosoma bovis* using irradiated cercariae of schistosomula of *S. Bovis*. **Parasitology**, **77**: 303-311
- Caffrey, C. R., Salter, J.P., Lucas, K.D., Khiem, D., Hsieh, I., Lim, K.C., Ruppel, A. & Mckerrow, J.H. (2002). SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **121**: 49-61
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. & Pierce, R. J. (1992). Vaccine strategies against schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **87**: 1-9
- Capron, A., Riveau, G., Grzych, J.M., Boulanger, D., Capron, M. & Pierce, R. (1994). Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. **Tropical and Geographical Medicine**, **46**: 242-246
- Cass, C.L., Johnson, J.R., Califf, L.L., Xu, T., Hernandez, H.J., Stadecker, M.J., Yates, J.R. 3rd & Williams, D.L. (2007). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **155**:84-93

- Chappel, L.H. (1993). In Modern Parasitology. **A textbook of parasitology**, ed. F.E.G. Cox, p. 157, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford
- Cheng, G. F., Lin, J. J., Feng, X. G., Fu, Z. Q., Jin, Y.M., Yuan, C.X., Zhou, Y.C. & Cai, Y.M. (2005). Proteomic analysis of diferentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. **Proteomics**, 5: 511-521
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L. & Archer, S. (1995). Antischistosomal drugs: past, present ... and future?. **Pharmacology & Therapeutics**, 68: 35-85. Review.
- Coelho-Castelo, A.A.A., Panunto-Castelo, A., Moreno, A.N., Dias-Baruffi, M., Jamur, M.C., Oliver, C., Roque-Barreira, M.C. & Rodrigues, V. (2002). Sm60, a mannose-binding protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. **International Journal for Parasitology**, 32: 1747-1754
- Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.M., Gow, N.A.R. & Booth, N. A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Molecular Microbiology**, 47: 1637-1651
- Curwen, R. S., Asthon, P. D., Johnston, D.A. & Wilson, R.A. (2004). The *schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life cycle stages. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 138 (1), 57-66
- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Sundaralingam, S. & Wilson, R.A. (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Molecular & Cellular Proteomics**, 5: 835-844
- Cutts, L. & Wilson., R.A. (1997). The protein antigens secreted in vivo by adult male *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, 114: 245-255
- De Bont, J. & Vercruysse, J. (1997). The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. **Parasitology Today**, 13: 255-262
- De Bont, J. & Vercruysse, J. (1998). Schistosomiasis in cattle. **Advances in Parasitology**, 41: 285-364

- De Bont, J., Claerebout, E., Riveau, G., Schacht, A.M., Smets, K., Conder, G., Brake, D.A., Capron, A. & Vercruysse, J. (2003). Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. **Veterinary Parasitology**, **113**: 135-144
- DeMarco, R., Kowaltowski, A.T., Mortara, R.A., & Verjovski-Almeida, S. (2003). Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307**: 831-838.
- Dessein, A.J., Begley, M., Demeure, C., Caillol, D., Fueri, J., dos Reis, M.G., Andrade, Z.A., Prata, A. & Bina, J.C. (1988). Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **Journal of Immunology**, **140**: 2727- 2736
- Dunne, D.W., Webster, M., Smith, P., Langley, J.G., Richardson, B.A., Fulford, A.J., Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Kariuki, H.C. & Ouma, J.H. (1997). The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection. **Parasite Immunology**, **19**: 79-89
- Eberl, M., Langermans, R.A., Vervenne, A.K., Nyame, R.D., Cummings, A.W., Thomas, P.S., Coulson, R.A. & Wilson, J. (2001). Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: is their role protective or subversive?. **The Journal of Infectious Diseases**, **183**: 1238-1247
- El-Ansary, A. (2003). Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **136**: 227-243
- Erttmann, K.D., Kleensang, A., Schneider, E., Hammerschmidt, S., Büttner, D.W. & Gallin, M. (2005). Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). **Biochimica et Biophysica Acta**, **1741**: 85-94

- Faveeuw, C., Mallevaey, T., Paschinger, K., Wilson, I.B., Fontaine, J., Mollicone, R., Oriol, R., Altmann, F., Lerouge, P., Capron, M. & Trottein, F. (2003). Schistosome N-glycans containing core alpha 3-fucose and core beta 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice. **European Journal Immunology**, **33**: 1271-1281
- Ferreras, M.C., Garcia, M.J., Pérez, C., Manga, Y., Ramajo, V., Escudero, A. & Garcia-Marín, J.F. (1998). A pathological study of experimental long-standing *Schistosoma bovis* infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, **119**: 479-484
- Ferreras, M.C., García-Iglesias, M.J., Manga-Gonzalez, M.Y., Pérez-Martínez, C. Mizinska, Y., Ramajo, V., González-Lanza, M.C., Escudero, A. & García-Marín, J.F. (2000). Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. **Journal of Veterinary Medicine**, **47**: 763-773
- Fishelson, Z. (1995). Novel mechanism of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **90**: 289-292
- Fitzsimmons, C. M., Stewart, T. J., Hoffmann, K. F. & Grogan, J.L. (2004). Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. **Parasite Immunology**, **26**: 371-376
- Geerts, S. & Gryseels, B. (2000). Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. **Clinical Microbiology Review**, **13**: 207-222
- Geyer, H., Wuhler, M., Kurohawa, T & Geyer, R. (2004). Characterization of keyhole limpet hemocyanin (KLH) glycans sharing a carbohydrate epitope with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. **Micron**, **35**:105-106
- Geyer, H., Wuhler, M., Resemann, A. & Geyer, R. (2005). Identification and characterization of Keyhole Limpet Hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Biological Chemistry**, **280**: 40731-40748

- Ghendler, Y., Arnon, R. & Fishelson, Z. (1994). *Schistosoma mansoni*: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor. **Experimental Parasitology, 78: 121-131**
- Gobert, G.N. (1998). Immunolocalization of Schistosoma Proteins. **Microscopy Research and Technique, 42: 176-185**
- Gobert, G.N., Stenzel, D.J., McManus, D.P. & Jones, M.K. (2003). The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument. **International Journal for Parasitology, 33: 1561-75. Review.**
- Goguen, J., Bugge, T. & Degen, J.L. (2000). Role of the pleiotropic effects of plasminogen deficiency in infection experiments with plasminogen-deficient mice. **Methods, 21: 179-183**
- Gray, G.R. (1974). The direct coupling of oligosaccharides and derivatized gels. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 163: 426-428**
- Grunclová, L., Fouquier, H., Hypsa, V. & Kopacek, P. (2003). Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. **Developmental and Comparative Immunology, 27: 651-660**
- Harlow, E. & Lane, D. (Ed.). (1988). Antibodies. A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor, New York, pp. 551-554**
- Harrop, R. & Wilson, R.A. (1993). Protein synthesis and release by cultured schistosomes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology, 107: 265-74**
- Hawley, S.B., Green, M.A. & Miles L.A. (2000). Discriminating between cell surface and intracellular plasminogen-binding proteins: heterogeneity in profibrinolytic plasminogen-binding proteins on monocytoid cells. **Thrombosis and Haemostasis, 84: 882-890**
- Hayes, M.J. & Moss, S.E. (2004). Annexins and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 322: 1166-1170**

- Hillyer, G.V., Garcia-Rosa, M., Simón Vicente, F. & Ramajo Martín, V. (1987). Antígenos cruzantes entre *Fasciola hepatica* y *Schistosoma bovis*. **V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca (España). Libro de resúmenes, 439-440**
- Hokke, C.H. & Deelder, A.M. (2001). Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. **Glycoconjugate Journal, 18: 573-587**
- Hokke, C.H. & Yazdanbakhsh, M. (2005). Schistosome glycans and innate immunity. **Parasite Immunology, 27: 257-264**
- Hokke, C.H., Deelder A.M., Hoffmann, K.F. & Wuhrer, M. (2007a). Glycomics-driven discoveries in schistosome research. **Experimental Parasitology, 117: 275-283**
- Hooke, C.H., Fitzpatrick, J.M. & Hoffmann, K.F. (2007b). Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends in Parasitology, 23: 165-174**
- Huang, H.H., Tsai, P.L. & Khoo, K.H. (2001). Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of *Schistosoma mansoni* cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X structure. **Glycobiology, 11: 395-406**
- Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M. & Korhonen, T.K. (2007). Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. **Microbiology, 153: 1112-1122**
- Hussein, M.F. (1971). The pathology of experimental schistosomiasis in calves. **Research in Veterinary Science, 12: 246-252**
- Hussein, M.F., Tartour, G., Imbabi, S.E. & Ali, K.E. (1975). The pathology of naturally-occurring bovine schistosomiasis in the Sudan. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 69: 217-25**
- Jang-Lee, J., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Tissot, B., Mathieson, W., Panico, M., Dell, A., Wilson, R.A. & Haslam, S.M. (2007). Glycomics Analysis of *Schistosoma mansoni* Egg and Cercarial Secretions. **Molecular & Cellular Proteomics, 6: 1485-1499**

- Jefferies, J.R., Campbell, A.M, van Rossum, A.J., Barret, J. & Brophy, P.M. (2001). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. **Proteomics**, **1**: 1128-1132
- Johansen, M.V., Fillie, Y., Monrad, J., Christensen, N.O. & Deelder, A. (1996). Experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. Circulating antigens and antibody responses to eggs and adult worm antigens during infection following treatment with praziquantel. **Parasitology**, **113**: 367-375
- Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S. & Brattig, N.W. (2003). Molecular cloning of an α -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1627**: 111-120
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P. & McManus, D.P. (2004). The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **Bioessays**, **26**: 752-65
- Jong, A.Y., Chen, S.H.M., Stins, M.F., Kim, K.S., Tuan, T. & Huang, S. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, **52**: 615-622
- Karanja, D.M., Colley, D.G., Ouma, J.H. & Secor, W.E. (1997). Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **56**: 515-521.
- Khoo, K.H., Chatterjee, D., Caulfield, J.P., Morris, H.R. & Dell, A. (1997). Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences. **Glycobiology**, **7**: 663-677

- Khoo, K.H., Huang, H.H. & Lee, K.M. (2001a). Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. **Glycobiology**, **11**: 149-163
- Khoo, K.H. & Dell, A., (2001b). Glycoconjugates from parasitic helminths: structure diversity and immunobiological implications. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **491**: 185-205
- Knudsen, G.M., Medzihradszky, K.F., Lim, K.C., Hansell, E. & McKerrow, J.H. (2005). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Molecular & Cellular Proteomics**, **4**: 1862-75
- La Flamme, A.C., Canagasabay, K., Harvie, M. & Bäckström, B.T. (2004). Schistosomiasis protects against multiple sclerosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 33-36
- Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D. & Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. **Journal of Immunology**, **148**: 124-128
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685
- Lawrence, J.A. (1977). *Schistosoma mattheei* in the ox: clinical pathological observations. **Research in Veterinary Science**, **23**: 280-287
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P. & Korhonen, T.K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiology Letters Reviews**, **25**: 531-552
- Lehr, T., Geyer, H., Maass, K., Doenhoff, M.J. & Geyer, R. (2007). Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. **Glycobiology**, **17**: 82-103
- Lewis, S.A. & Strand, M. (1991). Characterization of proteins and immunogens released by adult *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, **77**: 263-71

- Li ,Y., Auliff, A., Jones, M.K., Yi, X. & McManus, D.P. (2000). Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*. **Parasite Immunology**, **22**: 415-424
- Lin, Y. & He, S. (2006). Sm22.6 antigen is an inhibitor to human thrombin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **147**: 95-100
- Lind, S.E. & Smith, C.J. (1991). Actin accelerates plasmin generation by tissue plasminogen activator. **The Journal of Biological Chemistry**, **266**: 17673-17678
- Lindberg, R., Monrad, J., Johansen, M.V., Christensen, N.O. & Nansen, P. (1995). Tissue response of goats to single or repeated low-level doses and to a massive challenge dose of *Schistosoma bovis*. **Research in Veterinary Science**, **58**: 56-60
- Liu, J.M., Cai, X.Z., Lin, J.J., Fu, Z.Q., Yang, G.Z., Shi, F.H., Cai, Y.M., Shen, W., Taylor, M.G. & Wu, X.F. (2004). Gene cloning, expression and vaccine testing of *Schistosoma japonicum* SjFABP. **Parasite Immunology**, **26**: 351-358
- López-Abán, J., Ramajo, V., Pérez Arellano, J.L., Oleaga, A., Hillyer, G.V. & Muro, A. (1999). A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice infected with *Schistosoma bovis*. **Veterinary Parasitology**, **83**: 107-121
- López-Abán, J., Ramos, S., Ramajo, V., Oleaga, A. & Muro, A. (2004). Seroepidemiological study of infection by *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis* in cattle and sheep in western Spain. **Research and Reviews in Parasitology**, **64**: 41-47
- López-Abán, J., Oleaga, A., Ramajo, V., Casanueva, P., Pérez Arellano, J.L., Hillyer, G.V. & Muro, A. (2000). Vaccination of mice against *Schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, **91**: 33-42
- Losada, S., Chacón, N., Colmenares, C., Bermúdez, H., Lorenzo, A., Pointier, J.P., Theron, A., Alarcón de Noya, B. & Noya, O. (2005). Schistosoma: cross-reactivity and antigenic community among different species. **Experimental Parasitology**, **111**: 182-190

- Loukas, A., Jones, M.K., King, L.T., Brindley, P.J. & McManus, D.P. (2001). Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. **Infection and Immunity**, **69**: 3646-3651
- Lowry (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, **193**: 265-275
- MacGregor, A.N., Kusel, J.R. & Wilson, R.A. (1988). Isolation and characterisation of discoid granules from the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, **74**: 250-254
- Mahmoud, A.F. (2001). Schistosomiasis. **Tropical Medicine, Science and Practice**, Vol. 3. Ed. Geoffrey Pasvol & Stephen L Hoffman. Imperial College Press
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D. & Selkirk, M.E. (1991). Parasite antigen parasite genes: A laboratory manual for molecular Parasitology. **Cambridge University Press, Cambridge**.
- Majid, A., Bushara, H., Saad, A., Hussein, M., Taylor, M., dargie, J., Marshall, T. & Nelson, G. (1980). Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. III. Field testing of an irradiated *Schistosoma bovis* vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **29**: 452-455
- Mayoral, A., Nieto, C., Serrano, F., Habela, M., Breña, M. & Reina, D. (1989). Nuevas aportaciones al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. **VI Congreso Nacional de Parasitología. Cáceres (España). Libro de resúmenes**, pp. 180.
- Mei, H. & LoVerde, P.T. (1997). *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. **Experimental Parasitology**, **86**: 69-78
- Meyer, S., van Liempt, E., Imberty, A., van Kooyk, Y., Geyer, H., Geyer, R. & van Die, I. (2005). DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-Lewis^Y glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. **The Journal of Biological Chemistry**, **280**: 37349-37359

- Moné, H., Mouahid, G. & Morand, S. (1999). The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc-parasite relationships. **Advances in Parasitology**, **4**: 9-138
- Monrad, J., Christensen, N.O., Nansen, P., Johansen, M.V. & Lindberg, R. (1995). Acquired resistance against *Schistosoma bovis* after single or repeated low-level primary infections in goats. **Research in Veterinary Science**, **58**: 42-45
- Monrad, J., Sörén, K., Johansen, M.V., Lindberg, R & Ornbjerg, N. (2006). Treatment efficacy and regulatory host responses in chronic experimental *Schistosoma bovis* infections in goats. **Parasitology**, **133**:151-158
- Moss, S. E. & Morgan, R. O. (2004). The annexins. **Genome Biology**, **5**: 219
- Mountford, A.P. (2005). Immunological aspects of schistosomiasis. **Parasite Immunology**, **27**: 243-246
- Mundodi, V., Kucknoor, A.S. & Alderete, J.F. (2008). Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, **76**: 523-531
- Mutapi, F., Burchmore, T.F., Foucher, A., Marcus, Y., Nicoll, G., Midzi, N., Turner, C.M. & Maizels, R.M. (2005). Praziquantel treatment of individuals exposed to *Schistosoma haematobium* enhances serological recognition of defined parasite antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, **192**: 1108-1118
- Mutapi, F., Burchmore, R., Mduluza, T., Midzi, N., Turner, C.M. & Maizels, R.M. (2008). Age-related and infection intensity-related shifts in antibody recognition of defined protein antigens in a schistosome-exposed population. **The Journal of Infectious Diseases**, **15**: 167-175
- Nash, T.E. & Deelder, A.M. (1985). Comparison of four schistosome excretory-secretory antigens: phenol sulfuric test active peak, cathodic circulating antigen, gut-associated proteoglycan, and circulating anodic antigen. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **34**: 236-241

- Ngaiza, JR & Doenhoff, M.J. (1990). Blood platelets and schistosome egg excretion. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 193: 73-79**
- Nourel Din, M.S., Nibbeling, R., Rotmans, J.P., Polderman, A.M., Krijger, F.W. & Deelder, A.M. (1994). Quantitative determination of circulating soluble egg antigen in urine and serum of *Schistosoma mansoni*-infected individuals using a combined two-site enzyme-linked immunosorbent assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 50: 585-594**
- Nyame, A.K., Cummings, R.D. & Damian, R.T., (1987). *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues. **The Journal of Biological Chemistry, 262: 7990-7995**
- Nyame, A.K., Cummings, R.D. & Damian, R.T. (1988a). Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* schistosomula. **The Journal of Parasitology, 74: 562-572**
- Nyame, A.K., Cummings, R.D. & Damian, R.T. (1988b). Characterization of the high mannose asparagine-linked oligosacchararides synthesized by *Schistosoma mansoni* adult male worms. **Molecular and Biochemical Parasitology, 28: 265-274**
- Nyame, A.K., Pilcher, J.B., Tsang, V.C. & Cummings, R.D. (1996). *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le(x) determinants on myeloid cells. **Experimental Parasitology, 82: 191-200**
- Nyame, A.K., Debose-Boyd, R., Long, T.D., Tsang, V.C. & Cummings, R.D. (1998). Expression of LeX antigen in *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* and immune responses to Le^X in infected animals: lack of Le^X expression in other trematodes and nematodes. **Glycobiology, 8: 615-624**
- Nyame, A.K., Lewis, F.A., Doughty, B.L., Correa-Oliveira, R. & Cummings, R.D. (2003). Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. **Experimental Parasitology, 104: 1-13**

- Nyame, A.K., Kwar, Z.S. & Cummings, R.D. (2004). Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **426**: 182-200
- Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K. & Harn, D., Jr (2001). Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. **Journal of Immunology**, **167**: 442-450
- Olaechea, F.V., Christensen, N.O. & Henriksen, S.A. (1990). A comparison of the filtration, concentration, and thick smear techniques in the diagnosis of *Schistosoma bovis* infection in cattle and goats. **Acta Tropica**, **47**: 217-221
- Oleaga, A. & Ramajo, V. (2004). Efficiency of the oral, intramuscular and subcutaneous routes for the experimental infection of hamster and sheep with *Schistosoma bovis*. **Veterinary Parasitology**, **124**: 43-53
- Oleaga, A., Ramajo Hernández, A., Pérez Sánchez. R., & Ramajo, V. (2004). Prevalence and distribution of the bullfighting cattle farms infected with *S.bovis* in the province of Salamanca (Spain). **IX European Multicolloquium of Parasitology. Valencia (España). Libro Resúmenes. p. 283.**
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **58**: 902-920
- Pardo, J., Carranza, C., Turrientes, M., Perez Arellano, J.L., López Vélez, R., Ramajo, V. & Muro, A. (2004). Utility of *Schistosoma bovis* adult worm antigens for diagnosis of human schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot techniques. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **11**: 1165 -1170
- Pearce, E.J. & MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews. Immunology**, **2**: 499-511.
- Pearce, E.J., Basch, P.F. & Sher, A. (1986). Evidence that the reduced surface antigenicity of developing *Schistosoma mansoni* schistosomula is due to antigen shedding rather than host molecule acquisition. **Parasite Immunology**, **8**: 79-89

- Pearce, E.J., Hall, B.F. & Sher, A. (1990). Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of the phospholipase c-sensitive surface molecular resembling human decay accelerating factor. **Journal of Immunology**, **144**: 2751-2756
- Planchart, S., Incani, R.N. & Cesari, I.M. (2007). Preliminary characterization of an adult worm "vomit" preparation of *Schistosoma mansoni* and its potential use as antigen for diagnosis. **Parasitology Research**, **101**: 301-309
- Plow, E.F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L.A. & Hoover-Plow, J.L. (1995). The cell biology of the plasminogen system. **Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, **9**: 939-945
- Rak, A., Pylypenko, O., Durek, T., Watzke, A., Kushir, S., Brunsveld, L., Waldmann, H., Goody, R.S. & Alexandrov, K. (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. **Science**, **302**: 646-650
- Ramajo Martín, V. (1972). Contribución al estudio epizootiológico de la esquistosomiasis bovina (*Schistosoma bovis*) en la provincia de Salamanca. **Anales de la Facultad de Veterinaria de León**, **18**: 151-214
- Ramajo Martín, V. & Muro Alvarez, A. (1999). Parasitosis de los rumiantes. Parasitosis hemáticas. Esquistosomosis. En: **Parasitología Veterinaria. (Coord. Cordero del Campillo, M. y cols). Ed. Interamericana. División de Ciencias de la Salud de Mc Graw-Hill/ Interamericana de España. pp: 310-318**
- Ramajo Martín, V., López-Abán, J., Serrano, A.E., Oleaga, A. & Muro, A. (1995). A long-term study on the prevalence of gastrointestinal, hepatic and pulmonary parasitism in adult cattle from Salamanca province, western Spain. **Research and Reviews in Parasitology**, **55**: 231-234
- Robijn, M.L., Wuhrer, M., Kornelis, D., Deelder, A.M., Geyer, R. & Hokke, C.H. (2005). Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, adult worms and eggs. **Parasitology**, **130**: 67-77

- Rodríguez Osorio, M., Gómez García, V., Rojas González, J., Ramajo Martín, V., Manga González, Y. & González Lanza, C. (1993). Resistance to *Schistosoma bovis* in sheep induced by an experimental *Fasciola hepatica* infection. **The Journal of Parasitology**, **79**: 223-225
- Rodríguez-Osorio, M., Gómez-García, V., Rojas, J. & Ramajo-Martín, V. (1999). Humoral immune response and antigenemia in sheep experimentally infected with *Schistosoma bovis*. Cross-reactivity with *Fasciola hepatica*. **The Journal of Parasitology**, **85**: 585-587
- Rojas, M., Labrador, I., Concepción, J.L., Aldana, E. & Avilan, L. (2008). Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Acta tropica**, **107**: 54-58
- Ruppel, A., Kennedy, M.W. & Kusel, J.R. (2002). Schistosomiasis immunology, epidemiology and diagnosis. **Trends in Parasitology**, **18**: 50-52
- Saad, A.M., Hussein, M.F., Dargie, J.D., Taylor, M.G. & Nelson, G.S. (1980). *Schistosoma bovis* in calves: the development and clinical pathology of primary infections. **Research in Veterinary Science**, **28**: 105-111
- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Boqyo, M., Salter, J.P., Lim K.C., Franklin, C., Kim, J.H. & Caffrey, C.R. (2003). Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **131**: 65-75
- Salinas, G., Selkirk, M.E., Chalar, C., Maizels, R.M. & Fernandez, C. (2004). Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. **Trends in Parasitology**, **20**: 340-346
- Sánchez-Botija, R. (1954). Sobre la presencia de la schistosomiasis ovina en España. **Revista del Patronato de Biología Animal**, **1**: 31-36
- Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Pérez-Arellano, J.L., Carranza, C., Puente, S., López-Abán, J. & Muro, A. (2006). A new PCR-based approach for the specific

- amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. **Parasitology**, **133**: 581-587
- Saunders, N., Wilson, R.A. & Coulson PS. (1987). The outer bilayer of the adult schistosome tegument surface has a low turnover rate in vitro and in vivo. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **25**: 123-131
- Sayed, A.A., Simeonov, A., Thomas, C.J., Inglese, J., Austin, C.P. & Williams, D.L. (2008). Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, **14**: 407-412
- Schechtman, D., Tarrab-Hazdai, R. & Arnon, R. (2001). The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomosis. **Parasite Immunology**, **23**: 213-217
- Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, **68**: 850-858
- Secor, W.E. (2005). Immunology of human schistosomiasis: off the beaten path. **Parasite Immunology**, **27**: 309-316
- Seeberger, P.H. & Werz, D.B. (2007). Synthesis and medical applications of oligosaccharides. **Nature**, **446**:1046-105.Review.
- Siles-Lucas, M. & Gottstein, B. (2003). The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. **Trends in Parasitology**, **19**: 575-581
- Siles-Lucas, M., Uribe, López-Abán, J., Vicente, B., Orfao, A., Nogal-Ruiz, J.J., San Feliciano, A. & Muro, A. (2007). The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3 ζ recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. **Vaccine**, **25**: 7217-7223
- Simón Vicente, F. (1969). Esquistosomiasis en el ganado de algunas provincias del oeste de España (Schistosomiasis in the live stock of some spanish west provinces). **Suplemento Científico del Boletín Informativo del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, **187**: 41-52

- Simón Vicente, F. & Ramajo Martín, V. (1982). Present epizootiological stats of bovine schistosomiasis in Spain. **Revista Ibérica de Parasitología, Vol. extra: 423-429**
- Skelly, P.J. & Wilson, A. (2006). Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology, 63: 185-284**
- Skelly, P.J., Tielens, A.G. & Shoemaker, C.B. (1998). Glucose Transport and Metabolism in Mammalian-stage Schistosomes. **Parasitology Today, 14: 402-406**
- Skelly, P.J., Pfeiffer, R., Verrey, F. & Shoemaker, C.B. (1999). SRPM1lc, a heterodimeric amino acid permease light chain of the human parasitic platyhelminth, *Schistosoma mansoni*. **Parasitology 119: 569-576**
- Smith, P., Mangan, N.E., Walsh, C.M., Fallon, R.E., McKenzie, A.N., van Rooijen, N. & Fallon, P.G. (2007). Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. **Journal of Immunology, 178:4557-4566**
- Stanley, R.G., Ngaiza, J.R., Wambayi, E., Lewis, J. & Doenhoff, M.J. (2003). Platelets as an innate defence mechanism against *Schistosoma mansoni* infections in mice. **Parasite Immunology, 25: 467-473**
- Stochaj, W.R., Berkelman, T. & Laird, N. (2003). Preparative Two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients. In: Simpson, R.J. (Ed), Proteins and Proteomics a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 143-218**
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. & Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry, 376: 952-965**
- Taylor, M.E. & Drickamer, K. (2003). Structure-function analysis of C-type animal lectins. **Methods in enzymology, 363: 3-16**
- Tendler, M., Brito, C. A., Vilar, M. M., Serra-Freire, N. A., Diogo, C.M., Almeida, M.S., Delbem, A.C., Da Silva, J.F., Savino, W., Garratt, R.C., Katz, N. & Simpson, A.S. (1996). *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential

- basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 93: 269-273**
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76: 4350-4**
- Uribe, N., Siles-Lucas, M., López-Abán, J., Esteban, A., Suarez, L., Martínez-Fernández, A., del Olmo, E. & Muro, A. (2007). The Sb14-3-3ζ recombinant protein protects against *Schistosoma bovis* in BALB/c mice. **Vaccine, 25: 4533-4539**
- Van Balkom, B.W.M., Van Gestel, R.A., Brouwers, J.F.H.M., Krijgsveld, J., Tielens, A.G.M., Heck, A.J.R. & Van Hellemond, J.J. (2005). Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **Journal of Proteome Research, 4: 958-966**
- Van Die, I. & Cummings, R.D. (2006). Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy. **Chemical Immunology and Allergy, 90: 91-112**
- Van Die, I., van Vliet, S.J., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Bank, C.M., Appelmek, B., Geijtenbeek, T.B. & van Kooyk, K.Y. (2003). The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. **Glycobiology, 13: 471-8**
- Van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F., van Balkom, B.W., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B. & Tielens, A.G. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology, 36: 691-699. Review**
- Van Remoortere, A., Vermeer, H.J., van Roon, A.M., Langermans, J.A., Thomas, A.W., Wilson, R.A., van Die, I., van den Eijnden, D.H., Agoston, K., Kerekgyarto, J., Vliegthart, J.F., Kamerling, J.P., van Dam, G.J., Hokke, C.H. & Deelder, A.M. (2003). Dominant antibody responses to Fucalpha1-3GalNAc and Fucalpha1-2Fucalpha1-3GlcNAc containing carbohydrate epitopes in Pan troglodytes vaccinated and infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology, 105: 219-225**

- Vanegas, G., Quiñones, V., Carrasco-López, C., Concepción, J.L., Albericio, F. & Avilán, L. (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. **Parasitology Research**, Vol 101, 6: 1511-1516
- Vercruysse, J. & Gabriel, S. (2005). Immunity to schistosomiasis in animals: an update. **Parasite Immunology**, 27: 289-295
- Vercruysse, J., Sothgate, V.R. & Rollinson, D. (1985). The epidemiology of human and animal schistosomiasis in the Senegal River Basin. **Acta Tropica**, 42: 249-259
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco R., Martins E.A., Guimaraes, P.E., Ojopi, E.P., Paquola, A.C., Piazza, J.P., Nishiyama Jr., M.Y., Kitajima, J.P., Adamson, R.E., Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R.A., Malaquias, L.C., Marques, R.C., Miyasato, P.A., Nascimento, A.L., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M.A., Sa, R.G., Stukart, G.C., Soares, M.B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira A.M., Wilson, R.A., Menck, C.F., Setubal, J.C., Leite, L.C. & Dias-Neto, E. (2003). Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, 35: 148-157
- Viana da Costa, A., Gaubert, S., Fontaine, J., Lafitte, S., Seixas, A., Sampaio Silva, M.L., Capron, A. & Grzych, J.M. (1998). Murine *Schistosoma bovis* infection: analysis of parasitic and immune parameters. **Parasite Immunology**, 20: 143-453
- Waine, G. J., Becker, M., Yang, W., Kalinna, B. & McManus, D. P. (1993). Cloning, molecular characterization, and functional activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against schistosomiasis japonica. **Infection and Immunity**, 61: 4716-4723
- Webbe, G. & Jordan, P. Control. In: Human Schistosomiasis. (1993). P. Jordan, G. Webbe and R.F. Sturrock, eds, pp.405-451. Wallingford: CAB International

- Webster, B.L., Southgate, V.R. & Littlewood, D.T. (2006). A revision of the interrelationships of *Schistosoma guineensis*. **International Journal for Parasitology**, **36**: 947-955
- Wilson, R.A., Curwen, R.S., Braschi, S., Hall, S.L., Coulson, P.S. & Ashton, P.D. (2004). From genomes to vaccines via the proteome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 45-50
- Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M., Lochnit, G. & Geyer, R. (2000). *Schistosoma mansoni* cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. **Glycobiology**, **10**: 89-101
- Wuhrer, M., Balog, C.I., Catalina, M.I., Jones, F.M., Schramm, G., Haas, H., Doenhoff, M.J., Dunne, D.W., Deelder, A.M. & Hokke, C.H. (2006). IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. **The FEBS Journal**, **273**: 2276-2292
- Zaconne, P., Fehérvári, Z., Jones, F.M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Dunne, D.W. & Cooke, A. (2003). *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **European Journal of Immunology**, **33**:1439-49
- Zhang, Y., Bickle, Q.D., & Taylor, M.G. (2000). Cloning of *Schistosoma japonicum* 14-3-3 epsilon (Sj14-3-3 epsilon), a new member of the 14-3-3 family of proteins from schistosomes. **International Journal for Parasitology**, **30**:991-994
- Zhu, J.G., Lin, J. J., Feng, X.G., Wu, X.F., Zhou, Y.C. & Cai, Y.M. (2000). Cloning and Expression of Actin Gene of *Schistosoma japonicum* Chinese Strain. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)**, **32**: 545-549

ANEXO. PUBLICACIONES

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms

Ricardo Pérez-Sánchez, Alicia Ramajo-Hernández, Vicente Ramajo-Martín and Ana Oleaga

Unidad de Patología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (CSIC), Salamanca, Spain

Schistosoma bovis is a ruminant pathogen that is poorly known at a molecular level. With an aim of identifying the parasite proteins involved in host-parasite interplay, we studied two protein extracts that contain, respectively, the proteins excreted/secreted by the adult worm (ES) and the tegumental proteins exposed to the host (TG). The 2-DE, 2-D immunoblot and MS were employed to separate and identify the antigenic proteins and the most abundant non-antigenic proteins in each extract. There were some 400 and 600 spots detected in the ES and the TG extracts, respectively. Ninety-six spots were subjected to MS analysis and 64 of them were identified. Overall, we identified 18 *S. bovis* proteins located at the host-parasite interface, 16 of which have not been identified previously in this parasite, and one of which -lysozyme- has never been reported in a *Schistosoma* species. Of the proteins identified, at least 4 can counteract host defence mechanisms. The other proteins are also likely to play some role in the host-parasite relationships. Therefore, studies in greater depth on all these proteins will provide a better understanding of how this parasite interacts with its host and new strategies for anti-schistosome drug or vaccine design.

Received: June 6, 2005
Revised: July 21, 2005
Accepted: August 8, 2005

Keywords:

Excretory-secretory products / Immunome / Proteome / *Schistosoma bovis* / Tegument

1 Introduction

Schistosomes are one of the major causes of human and domestic animal disease in many tropical and subtropical countries. *Schistosoma bovis* is a parasite of ruminants that lives in the portal mesenteric system of the host. The geographic distribution of *S. bovis* includes practically the whole

of Africa, the Middle East (Israel, Iran, Iraq), and the Mediterranean region (Corsica, Sardinia, Sicily, Italy and Spain) [1, 2].

S. bovis belongs to the same species complex as the human pathogen *S. haematobium* and it is an immunological analogue of *S. haematobium* [3], making studies on *S. bovis* an attractive goal from the perspectives of both veterinary and comparative medicine.

Nonetheless, in spite of the veterinary importance of this parasite, studies on *S. bovis* have been scant and have mainly focused on the life cycle and epidemiology of the worm. The pathology and treatment of the infection and certain features of the host immune response have also been studied but little is known about the immunological mechanisms involved in ruminant schistosomiasis [1, 4–6]. Similarly, work aimed at the molecular characterization of *S. bovis* has been scarce and has focused on only a few molecules, such as GST, which has been addressed in several studies owing to its potential as a vaccine [7–9].

Correspondence: Dr. Ana Oleaga, Unidad Patología Animal, IRNASA, CSIC, C/ Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain

E-mail: oleaga@usal.es

Fax: +34-9-2321-9609

Abbreviations: ES, excretory-secretory extract; FaBP, fatty acid-binding protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Ig, immunoglobulin; Sb28GST, 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma bovis*; SMA, *Schistosoma mansoni* antigen; SOD, superoxide dismutase; TG, tegument extract; TGR, thioredoxin glutathione reductase

Like human schistosomes, adult *S. bovis* worms live for years in their definitive hosts despite the intense anti-schistosome immune response displayed by the hosts. Survival of the parasite in the host is mediated by mechanisms that operate on the tegument but, at the same time, many antigens targeted by the host immune response are also located on the tegument [10]. Furthermore, adult worms are metabolically active and release/secrete macromolecules from their epithelial surfaces – such as the gut and tegument – as part of their normal activities [11].

Because the parasite molecules involved in the host-parasite interplay must be among those that the parasite exposes to the host along the infection – such as the proteins secreted/excreted by the parasite and the proteins expressed on its exposed epithelial surfaces – knowledge of such proteins is a key factor for a better understanding of how this parasite interacts with its host. Furthermore, such knowledge should permit the identification of vaccine and drug targets [12] as well as the identification of diagnostic antigens.

Because protein identification is based on a comparison between the properties of the query protein and protein sequences present in the databases, this creates problems when working with organisms with unsequenced genomes, as is the case of *S. bovis*. Nevertheless, since the genome of the closely related species *S. mansoni* has been sequenced to more than $9 \times$ coverage, and since the sequencing of *S. japonicum* genome is also currently ongoing [12], it may be possible to identify *S. bovis* proteins by cross-species comparison [13].

With the aim of recognizing the parasite proteins involved in the host-*S. bovis* interplay, in the present work we constructed proteomic maps of tegumental and secreted/excreted proteins of adult *S. bovis* and we determined which of these proteins act as targets for antibodies (immunomes), identifying such antigenic proteins by MS. Because vaccine candidates may also arise from the non-antigenic proteins, another objective of this work was the identification of the most abundant non-antigenic proteins in each extract.

2 Materials and methods

2.1 Maintenance of *S. bovis* life cycle

A strain of *S. bovis* from Salamanca (Spain) was maintained at the laboratory in its natural hosts, *Planorbarius metidjensis* snails and sheep. Each snail was infected with five miracidia from eggs obtained from the faeces of experimentally infected sheep. The infected snails were maintained at the laboratory under controlled conditions until the emission of cercariae. Then, the sheep were infected percutaneously with 2000 *S. bovis* cercariae by submerging a forelimb for 30 min in 150 mL of cercarial suspension. At 6 months post-infection the sheep were sedated with ketamine (10 mg/kg) and then sacrificed by bleeding after section of jugular vein. *S. bovis* adult worms were recovered by dissection of mesenteric vessels from the entire gut and washed thoroughly in

PBS at 37°C. The viability of the worms was examined microscopically, after which intact parasites were processed immediately to obtain the two protein extracts to be studied (see below). The sheep were bled before and along the infection to obtain sera for immunoblots.

The experiments carried out with animals comply with current European law on animal experimentation.

2.2 Preparation of extracts of excretory-secretory products and tegumental proteins

Extracts of excretory-secretory products and surface-exposed tegumental proteins were prepared from live adult worms [14]. The parasites were washed twice in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) and then cultured for 6 h in the same medium at 37°C and 5% CO₂. This culture medium was recovered and designated ES. Following this, to obtain the tegumental extract the parasites were washed twice in TBS and incubated in 1% Triton X-100 in TBS at 4°C with gentle shaking for 30 min, after which the medium from this incubation, designated TG, was recovered. Both extracts – ES and TG – were clarified by centrifugation at $10\,000 \times g$, dialyzed against water for 24 h, and concentrated by vacuum centrifugation to a concentration of $>3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A cocktail of protease inhibitors (1 mM EDTA, 1 mM N-ethylmaleimide, 0.1 µM pepstatin A, 1 mM PMSF and 0.1 mM N-tosylamide-L-phenylalanine chloromethyl ketone) was added to each extract [15]. The protein concentration of the ES extract was measured with the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and that of the TG by the method of Markwell [16]. The reproducibility of the sample preparation procedure was verified by running polyacrylamide gels with protein extracts prepared from different batches of parasites.

2.3 2-DE

IEF was performed in 7-cm IPG strips (Bio-Rad) with linear pH ranges 3–10, 5–8, 7–10 and 4.7–5.9. All IEF was accomplished using a Protean IEF Cell (Bio-Rad) with a surface temperature of 20°C and a maximum current of 50 µA/strip.

The ES and TG samples, containing 25 µg for 2-D silver- and SYPRO Ruby-stained gels, or 40 µg for 2-D immunoblots, were diluted in 125 µL of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% IPG buffer of the respective pH gradient and bromophenol blue). The samples were allowed to mix gently for 1 h at room temperature before centrifugation at $18\,000 \times g$ over 30 min to remove all particulate material. The supernatants were applied to the IPG strips by in-gel rehydration at 20°C for at least 12 h, after which IEF was run for a total of 20 000 Vh.

Following IEF, the strips were reduced in equilibration buffer (6 M urea, 0.05 M Tris pH 8.8, 2% SDS and 20% glycerol) containing 2% DTT over 15 min and then alkylated in equilibration buffer containing 2.5% iodoacetamide for 10 min.

The second dimension was performed on 12, 7.5 or 5–20% gradient SDS-polyacrylamide gels using a Mini Protean cell (Bio-Rad). Running proceeded at 15 mA/gel for the first 15 min and then at 30 mA/gel. After running, the 2-D gels were either stained or electroblotted onto nitrocellulose membranes for immunoblot analysis.

The 2-D gels were routinely stained with silver stain or with a mass compatible silver stain (when the gel was to be used to MS analysis) [17]. Additional 2-D gels were stained with SYPRO Ruby fluorescent dye (Sigma, Saint Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions for quantitative analysis, and the 25 most abundant non-antigenic spots in each extract were selected and subjected to MS.

Silver-stained gels were scanned using an ImageScanner (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and SYPRO Ruby-stained gels were digitalized with the Fluor-S Multimager system (Bio-Rad). Analysis of 2-D gels was achieved using ImageMaster 2D Platinum Software v5.0 (Amersham Biosciences), including determination of the normalised volume corresponding to the area and intensity of all spots detected in SYPRO Ruby-stained 2-D gels.

2.4 Immunoblot analysis

Proteins were electrotransferred from 2-D gels to NC membranes at 400 mA for 90 min. Blots were blocked with 1% BSA in PBS for 1 h and then rinsed with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and incubated with sheep naive sera or sheep anti-*S. bovis* sera (taken at 6 months post-infection) at 1:50 dilution for 1 h. After three new washes, blots were incubated again with a horseradish peroxidase-labelled anti-sheep IgG (Sigma) at 1:2000 dilution for 1 h. All incubations were carried out at 37°C. Immunoblots were developed with the Immun-Star HRP Chemiluminiscent Kit (Bio-Rad) and images were digitalized with the Fluor-S Multimager system (Bio-Rad). Immunoblots and their homologous silver-stained gels were aligned to *pI* and *MW* and then matched by ImageMaster software in order to identify the antigenic spots in the gels.

2.5 MS and protein identification

2.5.1 In-gel digestion of proteins and sample preparation for MS analysis

The spots containing the antigenic proteins and the 25 major non-antigenic spots from each extract were excised manually and then digested automatically using a Proteineer DP protein digestion station (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). The digestion protocol used was as follows [18]: gel plugs were subjected to reduction with 10 mM DTT in 50 mM ammonium bicarbonate and alkylation with 55 mM iodoacetamide in 50 mM ammonium bicarbonate. The pieces of gel were then rinsed with 50 mM ammonium bicarbonate and ACN and dried under a stream of nitrogen. Modified porcine trypsin at a final concentration of 13 ng/mL in

50 mM ammonium bicarbonate was added to the dry pieces of gel and digestion was allowed to proceed at 37°C for 6 h. Finally, 0.5% TFA was added for peptide extraction. For PMF and the acquisition of LIFT TOF/TOF spectra, an aliquot of the above digestion solution was mixed with an aliquot of CHCA in 33% aqueous ACN and 0.1% TFA. This mixture was deposited onto a 600 μ m AnchorChip MALDI probe (Bruker-Daltonics) and allowed to dry at room temperature.

2.5.2 MALDI PMF, LIFT TOF/TOF acquisition and database searching

PMF spectra were measured on a Bruker Ultraflex TOF/TOF MALDI mass spectrometer (Bruker-Daltonics) [19] in positive ion reflector mode. Mass measurements were performed automatically through fuzzy logic based software or manually. Each spectrum was calibrated internally with mass signals of trypsin autolysis ions to reach a typical mass measurement accuracy of ± 25 ppm. The measured tryptic peptide masses were transferred through MS BioTools program (Bruker-Daltonics) as inputs to search the NCBIInr database using MASCOT software (Matrix Science, London, UK). When necessary, MS/MS data from LIFT TOF/TOF spectra were combined with PMF data for database searches with a parent ion mass tolerance of 20–40 ppm and a fragment ion mass accuracy of 0.25–0.50 Da.

3 Results

3.1 2-DE of ES and TG extracts

Regarding the ES, this extract was first electrofocused using 3–10 linear immobilised pH gradient strips and then electrophoresed in 5–20% gradient polyacrylamide gels. Staining of this gels with silver nitrate permitted the detection of around 350 spots, most of which were located between pH 5 to 9 (only two spots with a *pI* of < 5 were observed) over a broad range of *MW* (15–200 kDa) (not shown).

Once we had determined the spot *pI* and *MW* ranges, and in order to improve spot resolution and detection, the ES was electrofocused in 5–8 and 7–10 IPG strips and run in the second dimension in 12% polyacrylamide gels. As can be seen in Fig. 1B and C, the ES resolved in more than 400 spots, most of them located between pH 5 and 8. Only 19 spots had *pI* between 8 and 9 (Fig. 1C). In Fig. 1B, a group of poorly resolved proteins can also be observed; these were located between pH 5.3–5.8 and 50–200 kDa and, in addition, were strongly antigenic (see below). These proteins were better resolved using 4.7–5.9 IPG strips and 7.5% polyacrylamide gels (Fig. 1A). Neither the precipitation of ES with TCA/acetone nor its treatment with Clean-up kit (Bio-Rad), both in combination with cup loading sample application, improved the resolution of these proteins to a significant extent (not shown).

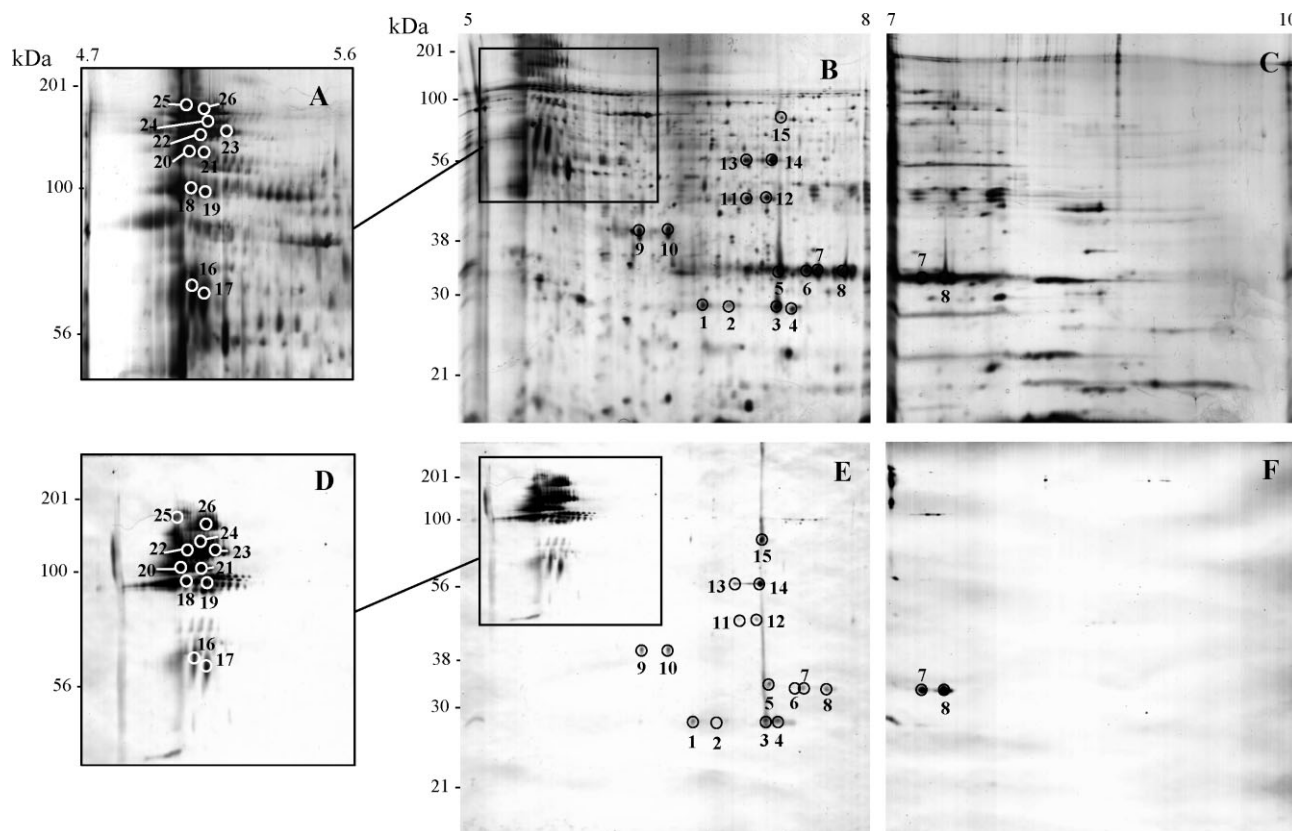


Figure 1. Two-dimensional images of the ES from adult *S. bovis* worms. (A, B, C) Silver-stained gels with pH ranges 4.7–5.9, 5–8 and 7–10. Acrylamide is 7.5% in (A) and 12% in (B) and (C). The antigenic spots revealed on blots from gels (B) and (C) using anti-*S. bovis* sheep serum are shown in (E) and (F). An enlarged partial view of (E) is offered in (D). Numbers indicate the antigenic spots, which were analysed by MS.

As in the case of the ES extract, TG extract was initially electrofocused using 3–10 linear immobilised pH gradient strips and electrophoresed in 5–20% polyacrylamide gels. Silver staining of these 2-D gels detected around 400 spots; these were poorly resolved and ranged from pH 5 to 10 (not shown). Bearing in mind *pI* range of the spots, spot resolution and detection were improved by electrofocusing the TG in 5–8 and 7–10 IPG strips and by running the second dimension in 12% polyacrylamide gels. In these gels, the TG proteins were resolved into approximately 600 spots, with *pI* between 5 and 9.6 and with MW between 15 and 160 kDa (Fig. 2A and B).

3.2 Antigenic proteins of ES and TG extracts

To investigate the antigenicity of the ES and TG proteins, immunoblots with anti-*S. bovis* sheep sera were obtained using 2-D gels in the pH ranges 5–8 and 7–10.

As shown in Fig. 1E and F, on the ES extract the anti-*S. bovis* sera revealed 17 major spots, together with a group of highly reactive proteins – rather poorly resolved into separate

spots – whose *pI* ranged between 5.3 and 5.5 and MW between 90 and 200 kDa. No antigenic proteins with *pI* higher than 8 were detected.

On the TG extract the anti-*S. bovis* sheep sera recognized 17 spots on the pH 5–8 2-D immunoblot and a further 5 additional spots on the pH 7–10 2-D immunoblot (Fig. 2C and 2).

When the ES and TG immunoblots were probed with sera from naive sheep, no proteins were detected (not shown). Nearly 6% of the spots of the ES and 4% of the spots of the TG contained antigenic proteins.

Matching of the immunoblots with their homologous silver-stained gels allowed us to localize the spots that contained the antigenic proteins in the 2-D gels.

In the case of the ES, we selected and cut 26 antigenic spots for MS analysis: 15 spots were cut from 2-D gels in the 5–8 pH range (Fig. 1B), while the remaining 11 were cut from 2-D gels in the 4.7–5.9 pH range (Fig. 1A). Table 1 shows the MS analysis results. 21 spots out of 26 were identified and those 21 spots corresponded to 6 different proteins: surface protein-fluke, serine protease inhibitor, enolase, cathepsin B, endopeptidase, 28-kDa GST (Sb28GST)

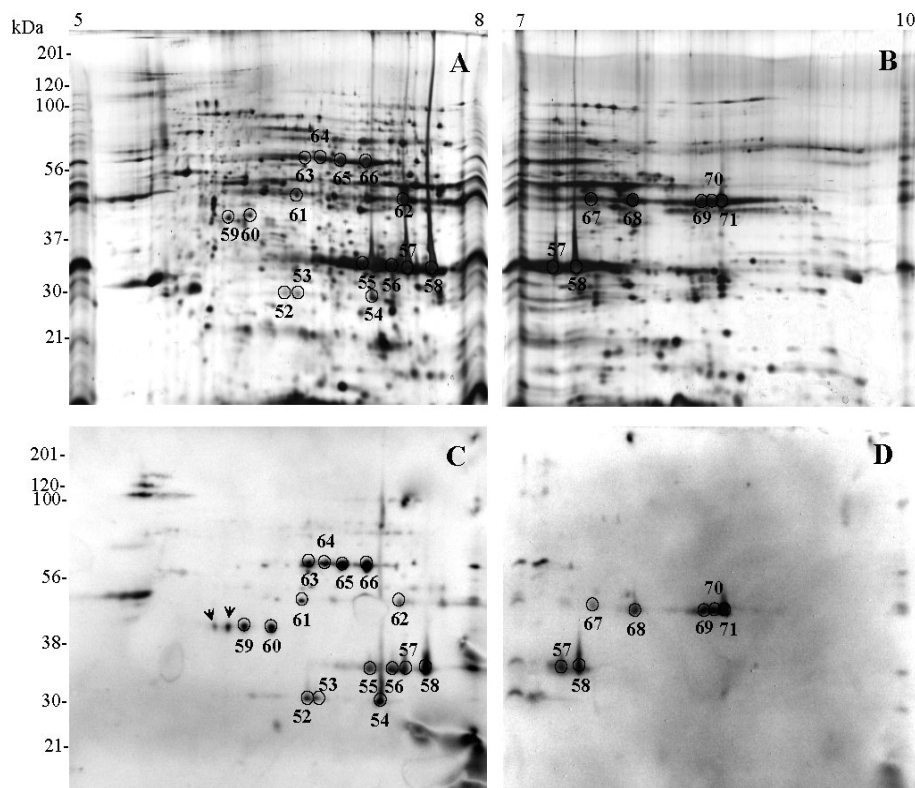


Figure 2. Two-dimensional images of the TG from adult *S. bovis* worms. (A, B) Silver-stained gels of 12% acrylamide and pH ranges of 5–8 and 7–10. The antigenic spots revealed on blots from gels (A) and (B) using anti-*S. bovis* sheep serum are shown in (C) and (D). Numbers indicate the antigenic spots, which were analysed by MS. Arrows show two antigenic spots not localized in the corresponding gel.

Table 1. Identification of the antigenic proteins of the ES (from Fig. 1) by MALDI-TOF-TOF MS and NCBI database searching

Spot	Protein	Species	Accession no. (NCBI)	MW (kDa) Theo/exp	p/ Theo/exp	Cover. %	MASCOT score
1	Tegument antigen (SMA22.6) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/6.7	14	85
2	Tegument antigen (SMA22.6) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/6.9	14	85
3	Tegument antigen (SMA22.6) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/7.2	14	93
5	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.2	42	158
6	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.4	35	135
7	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.5	30	127
8	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.7	29	110
9	Cathepsin B endopeptidase	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.3	21	87
10	Cathepsin B endopeptidase	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.5	19	85
13	Enolase ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/7.0	10	111
14	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/7.2	17	113
16	Serine protease inhibitor ^{b)}	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/62	4.9/5.1	–	49
17	Serine protease inhibitor ^{a)}	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/62	4.9/5.2	19	88
18	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/102	4.7/5.1	6	86
20	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/130	4.7/5.1	6	90
21	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/130	4.7/5.1	7	101
22	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/156	4.7/5.1	6	83
23	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/160	4.7/5.2	5	83
24	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/173	4.7/5.1	6	90
25	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/194	4.7/5.1	5	84
26	Surface protein – fluke	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/191	4.7/5.2	6	94

a) Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.

b) Spots unidentified using PMF data but identified using MS/MS data.

and tegument antigen (SMA 22.6). For each protein we identified between 2 and 8 isoforms, all of which showed different *pI* but nearly identical MW, except for the surface protein-fluke isoforms, which displayed an inverse trend, *i.e.* very similar *pI* but very different MW (102 to 194 kDa).

In the case of the TG, matching of the immunoblots with their homologous gels allowed us to localize 20 out of the 22 antigenic spots; these were cut from the gels and analysed by MS (Fig. 2). Up to 18 spots were identified, corresponding to 5 known proteins (Table 2): glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), actin, Sb28GST, tegument antigen (SMA 22.6) and enolase. The latter three were also present in the ES. For each protein, between 2 and 6 distinct isoforms were identified. Enolase was identified in 4 spots and in three of them (63, 64 y 65) the tryptic peptides matched the enolase of *S. mansoni* (AAC46886), whereas those of spot 66 matched that of *S. japonicum* (P33676). The other proteins, with the exception of Sb28GST, were identified by the similarity with the homologous of *S. mansoni*.

3.3 Quantitative analysis of ES and TG and identification of the most abundant non-antigenic proteins in each extract

To obtain a quantitative view of the ES and the TG, both extracts were resolved in 2-D gels in the 5–8 and 7–10 pH ranges and stained with SYPRO Ruby.

Analysis of the 2-D gels of the ES extract with the ImageMaster software revealed that the major components of the ES were 4 out the 6 previously identified antigenic proteins: surface protein-fluke, Sb28GST, serine

protease inhibitor and tegument antigen (Fig. 3). The ImageMaster software also helped us to select the 25 most abundant non-antigenic spots (Fig. 3), which were then cut and subjected to MS analysis. Of the 25 spots analysed, 9 were identified, corresponding to 7 different proteins (Table 3): fatty acid binding protein 15 (FaBP), superoxide dismutase (SOD), surface protein-fluke, thio-redoxin glutathione reductase (TGR), pre-pro serum albumin from the host, a protein similar to annexin A13 and a lysozyme. Interestingly, the non-antigenic spots 34 and 35 were identified as surface protein-fluke, a protein that, as just seen, is antigenic and a major protein in the ES. Nevertheless, these two spots had MW (47 and 53 kDa, Table 3) that were much lower than those antigenic spots identified previously as surface protein-fluke (102–194 kDa, Table 1). The MS/MS data identified spot 31 as an unknown protein from *S. japonicum* (AAW24721), which is in fact similar to annexin A13 from *Mus musculus* (GenBank AAP06415). Spot 38 was identified as a lysozyme, but owing to the absence of database entries for *Schistosoma* lysozymes and because of the similarity of the multiple database entries for other invertebrate lysozymes, it was not possible to identify the subject spot to any individual database entry.

Analysis of 2-D gels of TG extract revealed that the major protein in this extract was Sb28GST and that enolase and GAPDH (both also antigenic) were also very abundant. The most abundant non-antigenic 25 spots, all of them with *pI* between 5 and 8, are shown in Fig. 4. MS analysis of these 25 spots permitted the identification of 16 of them, corresponding to 9 proteins (Table 4): FaBP, SOD, GAPDH, fruc-

Table 2. Identification of the antigenic proteins of the TG (from Fig. 2) by MALDI-TOF-TOF MS and NCBI database searching

Spot	Protein	Species	Accession no. (NCBI)	MW (kDa) Theo/exp	<i>pI</i> Theo/exp	Cover. %	MASCOT score
52	Tegument antigen (SMA22.6) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/6.7	22	77
54	Tegument antigen (SMA22.6) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	P14202	23/29	7/7.2	14	82
55	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.1	28	115
56	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.3	49	195
57	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.4	41	166
58	28 kDa glutathione S-transferase	<i>S. bovis</i>	B45567	24/34	6.7/7.5	41	160
59	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/42	5.5/6.1	18	89
60	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/42	5.5/6.3	20	115
62	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.4	20	86
63	Enolase ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/6.8	22	90
64	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/6.9	14	97
65	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/62	6.2/7.0	16	86
66	Enolase	<i>S. japonicum</i>	P33676	48/62	6.2/7.2	24	125
67	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.6	17	100
68	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.9	21	90
69	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	21	115
70	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.5	17	81
71	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.6	17	134

a) Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.

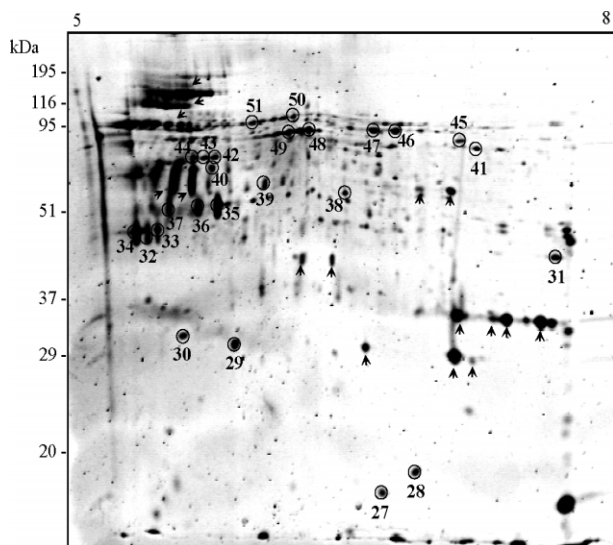


Figure 3. Quantitative view of the ES from adult *S. bovis* worms electrophoresed in a 2-D gel with pH 5–8 and 12% acrylamide stained with Sypro Ruby. Numbers indicate the 25 most abundant non-antigenic spots, which were subjected to MS analysis. Arrows show antigenic spots identified previously.

tose 1,6 bisphosphate aldolase, actin, alpha-tubulin and three unknown proteins from *S. japonicum* showing similarity, respectively, with citrate synthase precursor, Rab GDP-dissociation inhibitor and glycogen phosphorylase. GAPDH, identified in spot 81 (Fig. 4), had a MW (42 kDa, Table 4) that was slightly lower than that displayed by the antigenic isoforms of this protein (44 kDa) (Table 2). The 4 non-antigenic isoforms of actin identified in this gel had pI and MW that differed among them those forms (Table 4) and, in turn, were different from those of the two antigenic isoforms of actin identified previously (Table 2). FaBP and SOD were also found to be present in the ES extract.

4 Discussion

In view of our aim to identify the parasite proteins involved in host-parasite interplay, in the present work we started by obtaining two protein fractions – ES and TG – that respectively contained the proteins secreted by the adult worm and those expressed on its exposed tegumental surfaces [14].

Study of these two fractions – instead of study of more complex crude extracts – had the advantage that it limited the composition of the fractions to the components that are relevant with respect to the aims of our study and, as is well known, a simpler composition facilitates proteomic analysis [12]. However, this strategy has the disadvantage of affording much lower protein yields, which made it necessary to work at analytical scale (minigels).

The proteomic maps of the ES and TG extracts revealed considerably similarity as regards the number of spots detected (400, 600) as the distribution of the spots across nearly the same pI ranges and MW. This similarity is not surprising because, as well as the vomitus of the parasite, the ES contains components that are shed from the tegument [11] and hence both fractions are likely to share components, as indeed was observed.

Regarding the number of spots detected in the ES and TG, for other species of the genus *Schistosoma*, there are no equivalent proteomic maps with which to compare our results. Nevertheless, there are maps of the soluble proteome of adult *S. mansoni* [20] and maps of the soluble and hydrophobic proteomes of male and female *S. japonicum* [21]. Bearing in mind that these proteomes contain between 847 and 1288 spots, and that they come from complete worms, it seems reasonable to assume that the number of spots detected by us in the ES and TG of *S. bovis* is a fairly accurate estimation of the real number of components of both protein compartments.

The analysis by MS allowed us to identify, in the set of both extracts, 64 of the 96 spots analysed, which, in turn, corresponded to 19 proteins: 18 from the parasite and one

Table 3. Identification of the more abundant non-antigenic proteins of the ES (from Fig. 3) by MALDI-TOF-TOF MS and NCBI database searching

Spot	Protein	Species	Accession no. (NCBI)	MW (kDa) Theo/exp	pI Theo/exp	Cover. %	MASCOT score
27	Fatty acid binding protein 15	<i>S. bovis</i>	AAT39384	15/16	7.8/6.7	61	160
28	Superoxide dismutase (Cu-Zn) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	Q01137	16/19	6.6/6.8	30	133
31	Similar to annexin ^{b)}	<i>S. japonicum</i>	AAW24721	40/43	7.7/7.6	–	73
34	Surface protein fluke ^{b)}	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/47	4.7/5.2	–	54
35	Surface protein fluke ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/53	4.7/5.7	6	85
38	Lysozyme	–	–	–/59	–/6.4	33	88
41	Thioredoxin glutathione reductase	<i>S. mansoni</i>	AAK85233	66/80	6.4/7.2	9	80
48	Pre-pro serum albumin	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/92	5.8/6.2	19	120
49	Pre-pro serum albumin	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.0	13	84

a) Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.

b) Spots unidentified using PMF data but identified using MS/MS data.

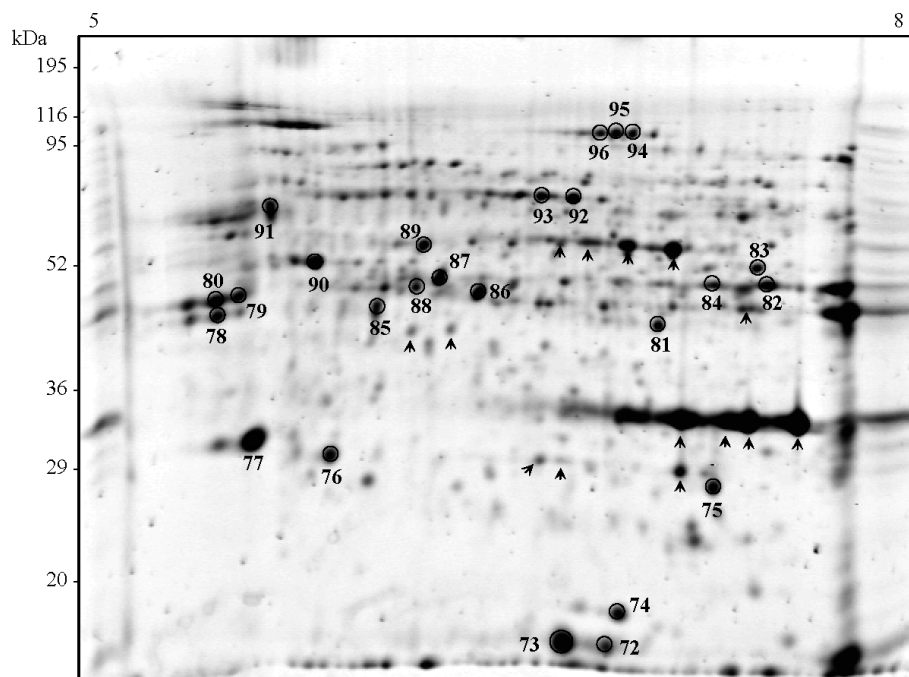


Figure 4. Quantitative view of the TG from adult *S. bovis* worms electrophoresed in a 2-D gel with pH 5–8 and 12% acrylamide stained with SYPRO Ruby. Numbers indicate the 25 most abundant non-antigenic spots, which were subjected to MS analysis. Arrows show antigenic spots identified previously.

Table 4. Identification of the more abundant non-antigenic proteins of the TG (from Fig. 4) by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry and NCBI/nr database searching

Spot	Protein	Species	Accession no. (NCBI)	MW (kDa) Theo/exp	pI Theo/exp	Cover. %	MASCOT score
72	Fatty acid binding protein 15	<i>S. bovis</i>	AAT39384	15/16	7.8/6.9	37	104
73	Fatty acid binding protein 15	<i>S. bovis</i>	AAT39384	15/16	7.8/6.7	32	101
74	Superoxide dismutase (Cu-Zn) ^{a)}	<i>S. mansoni</i>	Q01137	16/18	6.6/6.9	28	136
81	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^{b)}	<i>S. mansoni</i>	J10121	37/42	7.7/7.1	–	107
82	Fructose 1,6 bisphosphate aldolase	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/49	7.4/7.5	17	103
83	Similar to citrate synthase precursor ^{b)}	<i>S. japonicum</i>	AAP06106	42/51	7.2/7.4	–	67
84	Fructose 1,6 bisphosphate aldolase	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/49	7.4/7.3	17	99
85	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/46	5.5/6.0	23	95
86	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/48	5.5/6.4	18	113
87	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/50	5.5/6.3	29	152
89	Similar to Rab GDP-dissociation inhibitor ^{b)}	<i>S. japonicum</i>	AAW27297	51/57	6.9/6.2	–	69
90	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/52	5.5/5.8	29	172
91	Alpha-tubulin	<i>S. mansoni</i>	A48433	50/69	5.1/5.7	25	136
94	Similar to glycogen phosphorylase	<i>S. japonicum</i>	AAX27719	98/103	6.5/7.0	13	89
95	Similar to glycogen phosphorylase	<i>S. japonicum</i>	AAX27719	98/103	6.5/6.9	15	96
96	Similar to glycogen phosphorylase	<i>S. japonicum</i>	AAX27719	98/103	6.5/6.8	11	93

a) Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.

b) Spots unidentified using PMF data but identified using MS/MS data.

from the host. Except for Sb28GST and FaBP, these proteins were identified by their similarity to homologous proteins from other species of schistosomes (*S. mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*).

Regarding the immunome, the low proportion of antigenic spots detected in ES and TG is striking because the

components of both extracts are potentially exposed to the immune system of the host. Most of the antigenic spots were successfully analysed by MS (up to 39 of 46 spots), which allowed us to identify 8 antigenic proteins. Three of them, – enolase, Sb28GST and tegument antigen – were present in both extracts.

Enolase, a key glycolytic enzyme, is a multifunctional protein that belongs to a novel class of surface proteins that do not have the classical machinery for surface transport [22]. Studies carried out on helminths showed that enolase is present in the ES products of *F. hepatica* and in most tissues of adult *Onchocerca volvulus* [23, 24]. In these works, it is also demonstrated that the enolase from both helminths binds human plasminogen, suggesting that it may play a role in the fibrinolytic system and degradation of the host's extracellular matrix. This role may be important to *S. bovis*, which has an intravascular habitat and which must avoid, among other mechanisms, blood clotting. In this context, the antigenicity of *S. bovis* enolase seems to be disadvantageous for the parasite because the enzyme could be neutralized by the host immune response. However, *S. bovis* possesses at least four enolase isoforms and this multiplicity of isoforms would allow the parasite to use paralogues of an essential enzyme targeted by the immune system in order to avoid loss of function [25].

GST form a group of enzymes found in all animals, and they are involved in the detoxification and removal of harmful molecules from the organism. The 28-kDa GST from *S. mansoni* is an antigenic protein excreted by the parasite and transiently expressed on its tegumental surface [10]. This could explain our finding of Sb28GST in the ES and TG of *S. bovis*. Sb28GST is a promising vaccine candidate antigen for ruminant schistosomiasis [8, 26].

In human schistosomes, the 22.6-kDa tegumental antigen is a tegument-associated protein of unknown function. It has interest as vaccine candidate because the levels of IgE to 22.6-kDa antigen correlate with resistance to re-infection after chemotherapy [27, 28]. It has been reported that schistosomes release this antigen *in vitro* [29], which could explain the presence of the tegument antigen of *S. bovis* in both the TG and the ES.

The antigenic proteins identified only in the ES extract were cathepsin B endopeptidase, serine protease inhibitor (serpin), and surface protein-fluke. The presence of the latter two proteins in the ES – but not in the TG – was unexpected because they are tegument-associated proteins [10].

Known schistosome serpins are antigenic glycoproteins and are thought to play a role in protecting the parasite from the host immune response [30, 31].

The surface protein-fluke is a very abundant antigen in the ES extract. The broad range of MW (102–191 kDa) displayed by the numerous – and poorly resolved – spots identified as surface protein-fluke is noteworthy (Fig. 1A). One explanation for this phenomenon could be the different degree of glycosylation, since this protein is strongly mannosylated (unpublished data). However, the possibility of some degree of proteolytic degradation cannot be ruled out, since the non-antigenic spots 34 and 35, also identified in the ES extract as surface protein-fluke, had a considerably lower MW (47 and 53 kDa) than that of the antigenic spots (Tables 1 and 3).

S. bovis cathepsin B matched *S. mansoni* cathepsin B2, which is expressed only on the worm tegument [32]. Surprisingly, we only identified cathepsin in the ES, more in keeping with what has been reported for the cathepsin B1 of *S. mansoni*, which is secreted into the gut lumen of adult schistosomes [33]. It has been reported that cathepsins are interesting candidates as chemotherapeutic agents and also as selective diagnostic markers of disease [32].

Antigenic proteins identified only in the TG were actin and GAPDH. Actin exhibits several isoforms that are the products of highly homologous genes [20]. In the TG we identified 6 actin isoforms, two of which proved to be antigenic (spots 59 and 60). There are no data available concerning the antigenicity of *Schistosoma* actins [20], except for an antigenic isoform of 47 kDa from *S. japonicum* [34]. This antigenicity is not surprising since actin is exposed to the host immune system because it forms part of the spines on the surface of the worm [35].

GAPDH is a glycolytic enzyme, but it has been suggested that the presence of GAPDH on the surface of schistosomes may help to protect them from oxygen-mediated attack by phagocytes, and, in fact, it has been observed that IgG antibodies to this antigen correlate with resistance to infection, thus suggesting the possibility of using it as a vaccine [36]. We identified six antigenic isoforms and one non-antigenic isoform of GAPDH. In addition, and strikingly, the antigenic isoforms, but not the non-antigenic one, are carriers of the Lewis X group (unpublished data). These observations and the potential of *S. bovis* GAPDH isoforms as vaccine candidates require further study.

Analysis of the 25 most abundant non-antigenic spots of each extract revealed 10 additional proteins, of which FaBP and SOD are shared by both extracts.

FaBP are involved in the acquisition of fatty acids from the mammalian host blood. Different works with FaBP of *S. mansoni* and *S. japonicum* have reported the vaccinal value of these molecules [37, 38]. Although there are no similar studies with the FaBP of *S. bovis*, we believe that they may also be a good candidate for vaccine purposes.

SOD is an antioxidant enzyme involved in the neutralisation of toxic oxygen species produced by the host immune response, making it a vaccine candidate [39].

Three non-antigenic proteins were identified only in the ES: TGR, a lysozyme and a protein similar to annexin A13. TGR is an antioxidant enzyme whose inhibition can compromise the parasite survival, raising the possibility of this enzyme as a pharmacological target and/or vaccine candidate [40]. Regarding the lysozyme, this is the first time that this has been identified in schistosomes and, according to its MW and pI, it is similar to invertebrate lysozymes adapted to digestive functions [41]. The annexins are a family of calcium- and membrane-binding proteins that have been little studied in *Schistosoma*. Only the sequence of an annexin of *S. mansoni* is known, but because of the functions described for some annexins in other organisms (anticoagulant, anti-inflammatory, profibrinolytic), annexins could be very

important for the survival of schistosomes in their hosts, making very convenient to gain further insight into *Schistosoma* annexins [42, 43].

Five more non-antigenic proteins were identified only in the TG. Three of them (fructose 1,6 bisphosphate aldolase, a protein similar to citrate synthase precursor and one similar to glycogen phosphorylase) are involved in metabolic processes. The other two proteins were alpha tubulin, a structural protein, and the hypothetical protein similar to the Rab GDP-dissociation inhibitor, which is involved in membrane trafficking in eukaryotic cells [44].

Except for Sb28GST and FaBP, none of the proteins that we found in *S. bovis* have been identified before in this parasite. Regarding lysozyme, this is the first time it has been reported in a species of *Schistosoma*, and with respect to enolase, this has been shown to be immunogenic and for which there is also no previous data available.

Of the proteins identified, at least four can counteract host defence mechanisms (enolase, GADPH, serine protease inhibitor and SOD). The other proteins identified are also likely to play some role in the host-parasite relationships because they form part of the host-parasite interface and, in some cases such as annexin or TGR, because their molecular functions seem to suggest that this would indeed be the case.

In conclusion, the data reported here identify a set of parasite proteins that should be studied in greater depth to achieve a better understanding of how this parasite interacts with its host because this understanding could provide new strategies for anti-schistosome drug or vaccine design.

This research was supported by grant AGL2003-04235 from Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. We wish to express our acknowledgement to N. Skinner for supervising the English version of this manuscript.

5 References

- [1] De Bont, J., Vercruysse, J., *Adv. Parasitol.* 1998, 41, 285–364.
- [2] Moné, H., Mouahid, G., Morand, S., *Adv. Parasitol.* 1999, 4, 9–138.
- [3] Agnew, A. M., Murare, H. M., Lucas, S. B., Doenhoff, M. J., *Parasite Immunol.* 1989, 11, 329–340.
- [4] Johansen, M. V., Fillie, Y., Monrad, J., Christensen, N. O., Deelder, A., *Parasitology* 1996, 113, 367–375.
- [5] Viana da Costa, A., Gaubert, S., Fontaine, J., Lafitte, S. *et al.*, *Parasite Immunol.* 1998, 20, 143–453.
- [6] Rodríguez-Osorio, M., Gómez-García, V., Rojas, J., Ramajo-Martín, V., *J. Parasitol.* 1999, 85, 585–587.
- [7] Trottein, F., Godin, C., Pierce, R. J., Sellin, B. *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 54, 63–72.
- [8] Boulanger, D., Schneider, D., Chippaux, J. P., Sellin, B., Capron, A., *Int. J. Parasitol.* 1999, 29, 415–418.
- [9] De Bont, J., Claerebout, E., Riveau, G., Schacht, A. M. *et al.*, *Vet. Parasitol.* 2003, 113, 135–144.
- [10] Abath, F. G., Werkhauser, R. C., *Parasite Immunol.* 1996, 18, 15–20.
- [11] Cutts, L., Wilson, R. A., *Parasitology* 1997, 114, 245–255.
- [12] Wilson, R. A., Curwen, R. S., Braschi, S., Hall, S. L. *et al.*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004, 99, 45–50.
- [13] Barrett, J., Brophy, P. M., Hamilton, J. V., *Int. J. Parasitol.* 2005, 35, 543–553.
- [14] Loukas, A., Jones, M. K., King, L. T., Brindley, P. J., McManus, D. P., *Infect. Immun.* 2001, 69, 3646–3651.
- [15] Maizels, R. M., Blaxter, M. L., Robertson, B. D., Selkirk, M. E., *Parasite antigen parasite genes: A Laboratory Manual for Molecular Parasitology*, Cambridge University Press, Cambridge 1991.
- [16] Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E., *Anal. Biochem.* 1978, 87, 206–210.
- [17] Stochaj, W. R., Berkelman, T., Laird, N., in: Simpson, R. J. (Ed.), *Proteins and Proteomics a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2003, pp. 143–218.
- [18] Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 850–858.
- [19] Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 376, 952–965.
- [20] Curwen, R. S., Ashton, P. D., Johnston, D. A., Wilson, R. A. *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004, 138, 57–66.
- [21] Cheng, G. F., Lin, J. J., Feng, X. G., Fu, Z. Q., Jin, Y. M., *Proteomics* 2005, 5, 511–521.
- [22] Pancholi, V., *Cell. Mol. Life Sci.* 2001, 58, 902–920.
- [23] Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Buttner, D. W. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1627, 111–120.
- [24] Bernal, D., de la Rubia, J. E., Carrasco-Abad, A. M., Toledo, R. *et al.*, *FEBS Lett.* 2004, 563, 203–206.
- [25] Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A., Guimaraes, P. E. *et al.*, *Nat Genet.* 2003, 35, 148–157.
- [26] Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Pierce, R. J., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1992, 87, 1–9.
- [27] Li, Y., Auliff, A., Jones, M. K., Yi, X., McManus, D. P., *Parasite Immunol.* 2000, 22, 415–424.
- [28] Fitzsimmons, C. M., Stewart, T. J., Hoffmann, K. F., Grogan, J. L. *et al.*, *Parasite Immunol.* 2004, 26, 371–376.
- [29] Dunne, D. W., Webster, M., Smith, P., Langley, J. G. *et al.*, *Parasite Immunol.* 1997, 19, 79–89.
- [30] Blanton, R. E., Licate, L. S., Aman, R. A., *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994, 63, 1–11.
- [31] Ghendler, Y., Arnon, R., Fishelson, Z., *Exp. Parasitol.* 1994, 78, 121–131.
- [32] Caffrey, C. R., Salter, J. P., Lucas, K. D., Khiem, D. *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002, 121, 49–61.
- [33] Sajid, M., McKerrow, J. H., Hansell, E., Mathieu, M. A. *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 131, 65–75.
- [34] Zhu, J. G., Lin, J. J., Feng, X. G., Wu, X. F. *et al.*, *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* (Shanghai) 2000, 32, 545–549.
- [35] Jones, M. K., Gobert, G. N., Zhang, L., Sunderland, P., McManus, D. P., *Bioessays* 2004, 26, 752–765.
- [36] Waine, G. J., Becker, M., Yang, W., Kalinna, B., McManus, D. P., *Infect. Immun.* 1993, 61, 4716–4723.

- [37] Tendler, M., Brito, C. A., Vilar, M. M., Serra-Freire, N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **93**, 269–273.
- [38] Liu, J. M., Cai, X. Z., Lin, J. J., Fu, Z. Q., Yang, G. Z., *Parasite Immunol.* 2004, **26**, 351–358.
- [39] Mei, H., LoVerde, P. T., *Exp. Parasitol.* 1997, **86**, 69–78.
- [40] Salinas, G., Selkirk, M. E., Chalar, C., Maizels, R. M., Fernandez, C., *Trends Parasitol.* 2004, **20**, 340–346.
- [41] Grunclová, L., Fouquier, H., Hypsa, V., Kopacek, P., *Dev. Comp. Immunol.* 2003, **27**, 651–660.
- [42] Hayes, M. J., Moss, S. E., *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, **322**, 1166–1170.
- [43] Moss, S. E., Morgan, R. O., *Genome Biol.* 2004, **5**, 219.
- [44] Rak, A., Pylypenko, O., Durek, T., Watzke, A. *et al.*, *Science* 2003, **302**, 646–650.

Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms

Alicia Ramajo-Hernández¹, Ana Oleaga¹, Vicente Ramajo-Martín,
Ricardo Pérez-Sánchez^{*}

Unidad de Patología Animal, IRNASA (CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

Received 7 June 2006; received in revised form 19 September 2006; accepted 21 September 2006

Abstract

Schistosoma bovis is a parasite of wild and domestic ruminants that is broadly distributed throughout many tropical and temperate regions of the old world. *S. bovis* causes severe health problems and significant economic losses in livestock, but in contrast to human schistosomes, *S. bovis* has been little investigated at a molecular level. Since schistosome glycans and glycoproteins can play important roles in the host–parasite interplay, the aims of the present work were: (i) to characterize the glycans expressed by adult *S. bovis* worms on their excreted/secreted (ES) and tegumental (TG) glycoproteins and (ii) to identify their carrier protein backbones by mass spectrometry. Using a panel of lectins and monoclonal and polyclonal anti-glycan antibodies, we observed: (i) the absence of sialic acid in *S. bovis*; (ii) the presence of complex-type N-glycans and LDN antennae on ES glycoproteins; (iii) the presence of glycans containing the Fuc α 1-2Gal β motif in many TG glycoproteins, and (iv) the presence of glycans containing the Fuc α 1-3GlcNAc motif on many ES and TG glycoproteins but, simultaneously, the absence of the F-LDN(-F) glycans from both the ES and TG glycoproteins. Interestingly, we also found the Lewis^X and Lewis^Y antigens co-expressed on several TG isoforms of ATP:guanidino kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Finally, by ELISA we observed the presence of antibodies against Lewis^X, Lewis^Y and F-LDN(-F) in the sera of sheep experimentally infected with *S. bovis*.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Schistosoma bovis*; Glycans; Glycoproteins; Lewis antigens; Mass spectrometry

1. Introduction

Blood flukes of the genus *Schistosoma* are one of the major causes of human and domestic animal disease in many tropical and subtropical countries. There are three major species that infect humans, namely *S. mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*, and at least 10 species have been reported to infect domestic ruminants

naturally. Among these second species, only *S. mattheei* and *S. bovis* have received some attention, mainly because of their recognized veterinary significance (De Bont and Vercruysse, 1998; Vercruysse and Gabriel, 2005).

S. bovis lives in the portal mesenteric system of its ruminant hosts and shows a wide geographic distribution that includes practically the whole of Africa, the Middle East and the Mediterranean region (De Bont and Vercruysse, 1998; Moné et al., 1999). In addition, *S. bovis* belongs to the same species complex as the human pathogen *S. haematobium* and indeed is an immunological analogue of *S. haematobium* (Agnew et al.,

* Corresponding author. Tel.: +34 923219606; fax: +34 923219609.

E-mail address: ricarpe@usal.es (R. Pérez-Sánchez).

¹ These authors contributed equally to this work.

1989), making studies on *S. bovis* an attractive goal from the perspectives of both veterinary and comparative medicine.

Nonetheless, in spite of the veterinary importance of this parasite, studies on *S. bovis* have been scant in comparison with as those carried out on human schistosomes. In particular, work aimed at the molecular characterization of *S. bovis* has been scarce and has focused on only a few molecules, such as glutathione *S*-transferase, which has been addressed in several studies owing to its potential as a vaccine (Trottein et al., 1992; Boulanger et al., 1999; De Bont et al., 2003).

The need for a better understanding on how *S. bovis* interacts with its host at molecular level, as well as the search for diagnostic antigens and targets for new vaccines and drugs encouraged us to study the parasite molecules involved in the host–parasite interplay. Since such molecules should be among those that the parasite exposes to the host along the period of infection, we began our study by carrying out a proteomic analysis of the tegument and the excreted/secreted products of the adult worms (Pérez-Sánchez et al., 2006). This study allowed us to identify 18 parasite proteins located at the host–parasite interface. At least four of these proteins (enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, serine protease inhibitor and superoxide dismutase) could counteract the host defence mechanisms. The remaining proteins identified are also likely to play some kind of role in the host–*S. bovis* relationships not only because they form part of the host–parasite interface but also because, for many of them, their molecular functions suggest that this would indeed be the case.

While very important, proteins are not the only kind of parasite molecules involved in the schistosome–host interactions. It is currently recognized that schistosomes produce a variety of complex glycans, which are expressed on glycolipids and glycoproteins, and that these glycans can play important roles in the induction and modulation of the host immune response as well as in the immunopathology of schistosomiasis (Hokke and Deelder, 2001; Nyame et al., 2003, 2004; Hokke and Yazdanbakhsh, 2005). For this reason, schistosome glycans and glycoconjugates are now regarded as good immunodiagnostic targets and potential targets for vaccine development (Nyame et al., 2003, 2004). In fact, schistosome glycobiology has recently become an area of intensive research and a significant amount of structural and functional information on schistosome glycans is available, at least for human schistosomes. What is still almost completely lacking, however, is information about which glycoproteins these glycans are expressed on (Hokke and Yazdanbakhsh, 2005).

Regarding *S. bovis*, almost nothing is known about its glycans and the glycoproteins on which are they expressed, thus making it necessary to investigate which proteins of *S. bovis* are glycoproteins and how these glycoproteins are glycosylated. Accordingly, the objectives of this work were to characterize the glycans expressed by adult *S. bovis* worms on their excreted/secreted and tegumental glycoproteins and to identify the glycoproteins bearing those glycans.

In the present study we paid particular attention to some carbohydrate motifs that are known to occur in human schistosomes and have immunogenic and immunomodulatory properties, such as GalNAc β 1-4GlcNAc β 1 (LDN), GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (LDN-F), Fuc α 1-3GalNAc β 1-4GlcNAc β 1 (F-LDN), Fuc α 1-3GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (F-LDN-F) and Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (Lewis^X, Le^X) (Van Liempt et al., 2004; Hokke and Yazdanbakhsh, 2005; Meyer et al., 2005; Robijn et al., 2005; Van de Vijver et al., 2006; Wuhler et al., 2006a,b). Additionally, although the tetrasaccharide Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1 (Lewis^Y, Le^Y) has so far not been found in human schistosomes (Nyame et al., 1998), here we also investigated its presence on the glycoproteins of adult *S. bovis* worms.

2. Material and methods

2.1. Maintenance of *Schistosoma bovis* life-cycle

A strain of *S. bovis* from Salamanca (Spain) was maintained at the laboratory in its natural hosts: *Planorbarius metidjensis* snails and sheep. Each snail was infected with five miracidia from eggs obtained from the faeces of experimentally infected sheep. The infected snails were maintained at the laboratory under controlled conditions until the emission of cercariae. Then, the sheep were infected percutaneously with 2000 *S. bovis* cercariae by submerging a fore-limb for 30 min in 150 ml of cercarial suspension. At 6 months post-infection the sheep were sedated with ketamine (10 mg/kg) and then sacrificed by bleeding after sectioning the jugular vein. *S. bovis* adult worms were recovered by dissection of mesenteric vessels from the entire gut and washed thoroughly in PBS at 37 °C. The viability of the worms was examined microscopically, after which intact parasites were processed immediately to obtain the two protein extracts to be studied (see below). The sheep were bled before and along the infection to obtain sera. As a rule, bleeding was performed once a week during the first 4 weeks post-infection and then once a month until the time of sacrifice.

2.2. Preparation of extracts of excretory–secretory and tegumental proteins

Extracts of excretory–secretory and tegumental proteins were prepared from live adult worms (males and females) according to the procedure described by Loukas et al. (2001). Briefly, the parasites were washed twice in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) and then cultured for 6 h in the same medium at 37 °C and 5% CO₂. This culture medium was recovered and designated ES. Following this, to obtain the tegumental extract the parasites were washed twice in TBS and incubated in 1% Triton X-100 in TBS at 4 °C with gentle shaking for 30 min, after which the medium from this incubation, designated TG, was recovered. Both extracts – ES and TG – were clarified by centrifugation at 10,000 × *g*, dialyzed against water for 24 h, and concentrated by vacuum centrifugation to a concentration of >3 µg/µl. A cocktail of protease inhibitors (1 mM EDTA, 1 mM *N*-ethylmaleimide, 0.1 µM pepstatin A, 1 mM PMSF and 0.1 mM *N*-tosylamide-L-phenylalanine chloromethyl ketone) was added to each extract (Maizels et al., 1991). The protein concentration of the ES extract was measured with the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and that of the TG by the method of Markwell et al. (1978).

2.3. SDS-PAGE

Protein samples were subjected to SDS-PAGE in a Laemmli (1970) discontinuous gel system using the Mini-Protean Cell system (Bio-Rad). The stacking gel was 3% and the resolving gel was a 5–20% gradient. Usually, the gels were loaded with 10 µg of protein per lane. After running, the gels were either electrotransferred onto nitrocellulose membranes or stained with silver nitrate. The electrotransfer step was carried out in 2 mM Tris, 192 mM glycine buffer, pH 8, at 400 mA for 90 min.

2.4. Two-dimensional electrophoresis (2DE)

2DE was performed as described in Pérez-Sánchez et al. (2006). The isoelectric focusing (IEF) was run in 7 cm IPG strips (Bio-Rad) with linear pH ranges of 5–8 and 7–10 using a Protean IEF Cell (Bio-Rad). Protein samples (25 µg of ES or TG, as well as immunoprecipitation pellets—see below) were diluted in 125 µl of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% IPG buffer, bromophenol blue traces) and were allowed to mix gently for 1 h at room temperature before centrifugation at 18,000 × *g* over 30 min to remove all particulate material. The supernatants were applied to the IPG strips by in-gel rehydration at 20 °C for at least 12 h. IEF was run at 50 µA/strip for a total of 20,000 Vh. Next, the strips were reduced in equilibration buffer (6 M urea, 0.05 M Tris, pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol) containing 2% DTT over 15 min and then alkylated in equilibration buffer containing 2.5% iodoacetamide for 10 min. The second dimension was performed on 12% polyacrylamide gels and the resulting 2D gels were either stained with a mass spectrometry-compatible silver stain (Stochaj et al., 2003), or electrotransferred onto nitrocellulose membranes in a similar way to that of the 1D gels. The stained 2D gels were scanned using an ImageScanner (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and their images were analysed using the ImageMaster 2D Platinum Software v5.0 (Amersham Biosciences).

2.5. 1D and 2D lectin blotting

Samples of ES and TG extracts, previously resolved by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes, were probed with the eight lectins listed in Table 1. The digoxigenin-labelled lectins GNA, SNA, MAA, DSA and PNA, all of them included in the DIG Glycan Differentiation Kit (Roche, Mannheim, Germany), were used following the instructions of the kit manufacturer. Briefly, the nitrocellulose membranes

Table 1
Lectins used as probes in the screening of the ES and TG extracts

Lectin	Source	Carbohydrate motif binding specificity	Label	Working concentration (µg/ml)
GNA	<i>Galantus nivalis</i>	Man α 1-3Man, Man α 1-6Man, Man α 1-2Man	Digoxigenin	1
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuNAc α 2-6Gal β	Digoxigenin	1
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	NeuNAc α 2-3Gal β	Digoxigenin	5
DSA	<i>Datura stramonium</i>	Gal β 1-4GlcNAc (LacNAc), GlcNAc-Ser/Thr	Digoxigenin	1
PNA	<i>Arachis hypogea</i>	Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr	Digoxigenin	10
WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc β 1-4GlcNAc (LDN)	Biotin	1
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc α 1-3GlcNAc	Biotin	1
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc α 1-2Gal β	Biotin	1

were blocked and subsequently incubated with the corresponding lectin (see Table 1 for lectin concentration). Then, they were incubated with an alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (1:1000) and the reactive bands were revealed with a substrate solution containing NBT and X-phosphate.

The biotinylated lectins WFA, LTA and UEA-I (Vector Laboratories, Peterborough, UK) were used as follows. Nitrocellulose membranes were blocked with 3% BSA in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), washed three times with TBS containing 0.3% Tween-20, and incubated with the respective lectin diluted in dilution buffer (TBS, 0.05% Tween-20, 1% BSA). After three new washes, the membranes were incubated with 1:1000 avidin-peroxidase (Sigma, Saint Louis, MO, USA) in dilution buffer and washed again 3 times. Reactive bands were revealed with 4-Cl-1-naphthol. Incubations were carried out at room temperature for 1 h, and the washes were done for 10 min per each wash.

The lectins GNA, WFA, LTA and UEA-I were those that recognized bands on one or both extracts. Consequently, a second 1D blotting with these lectins was performed, but this time including the appropriate monosaccharide as a lectin binding inhibitor, respectively, α -methyl-D-mannoside (0.5 M), *N*-acetyl-D-galactosamine (0.2 M) and L-fucose (1 and 3 M). All three monosaccharides were purchased from Sigma.

After the inhibition experiments had been completed, these four lectins were used again as probes in a subsequent 2D lectin blotting. The ES extract was resolved in 2D gels in the 5–8 and 7–10 pH ranges, transferred to nitrocellulose membranes, and re-screened with GNA, WFA and LTA. The TG extract was re-screened in a similar way, but in this case with LTA and UEA-I. Blotting conditions were similar to that used in the 1D lectin analysis. The resulting 2D blots were scanned and their images were analysed using the ImageMaster software. These blots and their homologous silver-stained gels were aligned to isoelectric point (pI) and molecular weight (MW) and then matched by ImageMaster software in order to identify the lectin-binding spots in the gels. Then, the spots of interest were excised from the gels and analysed by mass spectrometry for protein identification.

2.6. 1D Western blotting

1D Western blotting was performed to investigate the presence of Le^X, Le^Y and F-LDN(-F) on the ES and TG glycoproteins. As probes, we used two anti-Le^X and anti-Le^Y monoclonal antibodies and a rabbit anti-Keyhole

limpet haemocyanin (KLH) polyclonal serum that recognizes the carbohydrate epitopes F-LDN(-F) (Geyer et al., 2005).

ES and TG samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 2% BSA in PBS and washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20. Following this, they were incubated with 2 μ g/ml of primary antibody in dilution buffer (PBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA): anti-Le^X and anti-Le^Y monoclonal antibodies (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and rabbit anti-KLH polyclonal antibody (Sigma). After three new washes, the membranes were incubated with the respective secondary antibody: peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM (1:1000) (Stressgen Bioreagents, Victoria, Canada) and peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG (1:5000) (Sigma). The membranes were washed again and the reactive bands were visualised with either 4-Cl-1-naphthol or with the Immun-Star HRP chemiluminescent substrate (Bio-Rad) followed by digitalization using the Fluor-S Multimager system (Bio-Rad). Incubations were performed at 37 °C for 1 h, and the washes were carried out at room temperature for 10 min per each wash.

2.7. Immunoprecipitation (IP)

The glycoproteins of the TG extract that were recognized in the Western blots by the monoclonal antibodies anti-Le^X and anti-Le^Y were subsequently separated by IP. The IP protocol was an adaptation of that described by Harlow and Lane (1988) and proceeded as follows.

Samples of 100 μ g of protein G-Sepharose 4B (Sigma) were sensitised with 10 μ g of each monoclonal antibody in 100 μ l of PBS. The reactions were carried out in 1.5 ml test tubes at 4 °C for 12–16 h with gentle shaking. They were then centrifuged for 2 min at 3000 rpm and the supernatants were removed (non-bound material). The pellets (bound antibody) were washed three times with 1 ml of PBS and resuspended in 100 μ l of PBS. The binding of the antibodies to protein G was checked by running 10 μ l of each supernatant and pellet in SDS-PAGE. In parallel, to discard direct binding of TG components to protein G, 100 μ g of TG were incubated with 100 μ g of protein G-Sepharose 4B.

Both monoclonal-sensitised protein G-Sepharose pellets (containing close to 9 μ g of bound antibody each) were then incubated with 100 μ g of TG in a total volume of 100 μ l of PBS at 37 °C for 1 h with gentle shaking. Following this, they were centrifuged as above

and the supernatants were removed and preserved. The pellets were washed and resuspended in 100 μ l of PBS. The IP results were checked by running 20 μ l aliquots of both supernatants and pellets in SDS-PAGE. The remaining 80 μ l of each pellet was then electrophoresed in 2D gels in the 5–8 and 7–10 pH ranges. The gels were stained with a mass spectrometry-compatible silver stain, and the major spots corresponding to the immunocaptured proteins were excised from the gels and analysed by mass spectrometry.

2.8. Mass spectrometry analysis and protein identification

These analyses were carried out as described in Pérez-Sánchez et al. (2006). Protein spots were excised manually and then digested automatically using a Proteiner DP protein digestion station (Bruker-Daltonics). The digestion protocol used was that of Schevchenko et al. (1996). For peptide mass fingerprinting and the acquisition of LIFT TOF/TOF spectra, an aliquot of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 33% aqueous acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid was mixed with an aliquot of the above digestion solution and the mixture was deposited onto an AnchorChip MALDI probe (Bruker-Daltonics).

Peptide mass fingerprint spectra were measured on a Bruker Ultraflex TOF/TOF MALDI mass spectrometer (Bruker-Daltonics) (Suckau et al., 2003) in positive ion reflector mode. Mass measurements were performed automatically using fuzzy logic-based software or manually. Each spectrum was calibrated internally with the mass signals of trypsin autolysis ions to reach a typical mass measurement accuracy of ± 25 ppm. The measured tryptic peptide masses were transferred by means of the MS BioTools program (Bruker-Daltonics) as inputs to search the NCBI database using Mascot software (Matrix Science; London, UK). When necessary, MS/MS data from LIFT TOF/TOF spectra were combined with PMF data for database searches with a parent ion mass tolerance of 20–40 ppm and a fragment ion mass accuracy of 0.25–0.50 Da.

2.9. ELISA

ELISA was performed to investigate the presence of antibodies against Le^X, Le^Y and F-LDN(-F) in the sera of sheep experimentally infected with *S. bovis*. To do so, the sera of three sheep were analysed by ELISA against the following antigens: ES and TG extracts, KLH (Sigma) and the neoglycoproteins LNFPIII-BSA (Dextra Laboratories, Reading, UK) and Le^Y

hexasaccharide-BSA (Le^Y-BSA). Le^Y-BSA was synthesized by the reductive amidation method of Gray (1974), following a procedure similar to that described by Nyame et al. (1996). Briefly, 200 μ g of Le^Y-hexasaccharide (Dextra Laboratories) was mixed with 67 μ g of BSA and 52 μ g of NaBH₃CN in 50 μ l 0.2 mM KH₂PO₄ pH 7.0 and left at room temperature for 14 days to allow covalent binding of the sugar to BSA. The neoglycoprotein synthesized was purified from uncoupled sugar and salts by dialysis using Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Analysis by Western blot with the anti-Le^Y monoclonal antibody revealed that the oligosaccharide was coupled to BSA.

ELISA plates were coated overnight at room temperature with 0.2 μ g of antigen/well in 100 μ l of carbonate buffer, pH 9.6, and subsequently blocked with 5% BSA in PBS at 37 °C for 2 h. The wells were washed four times with PBS containing 0.05% Tween 20 and incubated at 37 °C for 1 h with 100 μ l of the sera diluted 1:50 in dilution buffer (PBS, 0.3% Tween 20, 1% BSA). After four new washes, the wells were incubated at 37 °C for 1 h with 100 μ l of peroxidase-labelled donkey anti-sheep IgG (1:8000) (Sigma) or peroxidase-labelled rabbit anti-sheep IgM (1:6000) (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) and washed again four times. Finally, *ortho*-phenylenediamine was used as chromogen substrate for peroxidase.

3. Results

3.1. 1D lectin blots of ES and TG extracts

As can be seen in Fig. 1(A), both extracts were resolved by SDS-PAGE in approximately 30 bands, whose MWs ranged between 7 and 200 kDa. Fig. 1(B) shows that lectins SNA, MAA, DSA and PNA did not recognize any band on any extract apart from some unspecific binding of lectin MAA on TG. This lack of reactivity indicates that the ES and TG glycoproteins do not contain sialic acid (NeuNAc), lactosamine (LacNAc) and Gal β 1-3GalNAc.

Lectins GNA and WFA recognized a group of bands of high MW on the ES – although not on the TG –, which is indicative of the presence, respectively, of terminal mannosyl residues and GalNAc β 1-4GlcNAc β 1 (LDN) on the ES glycoproteins. By contrast, lectin UEA-I recognized numerous bands on the TG – but not on the ES –, signalling the presence of the Fuc α 1-2Gal β terminal sequence on numerous TG glycoproteins. Finally, lectin LTA recognized numerous

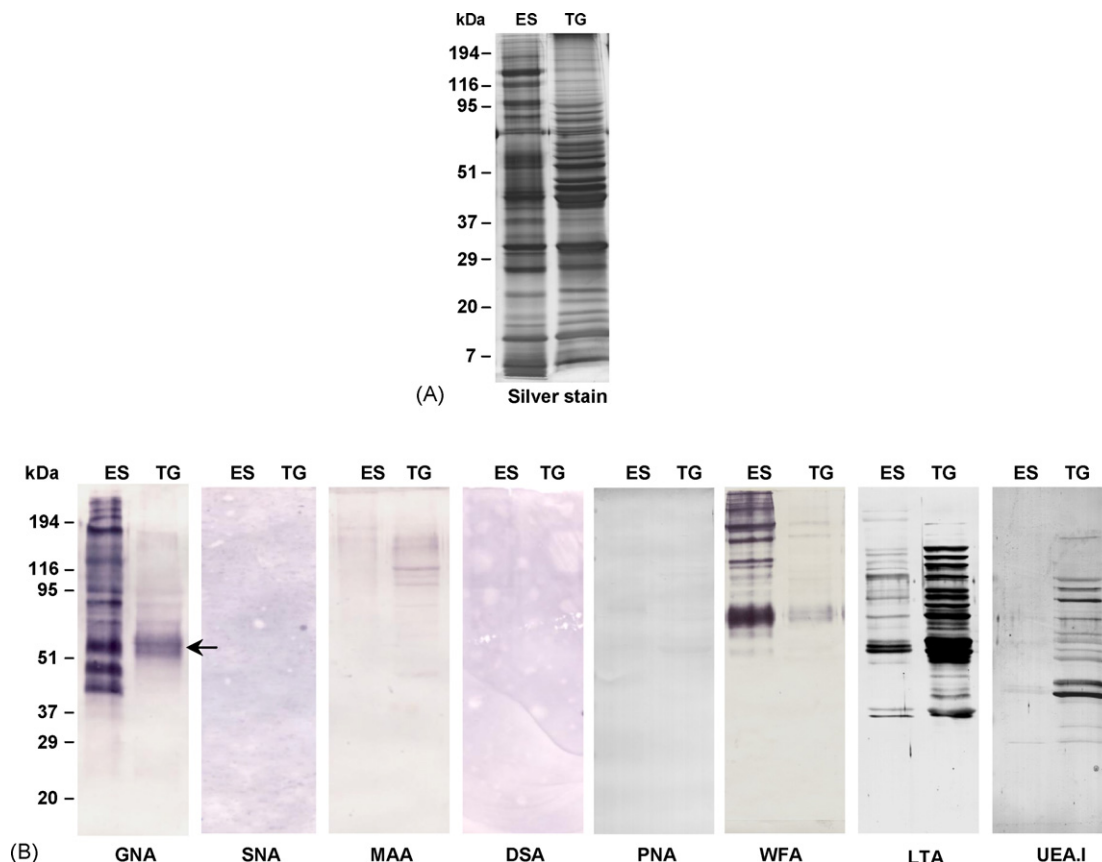


Fig. 1. (A) SDS-PAGE: the ES and TG extracts were resolved in 5–20% polyacrylamide gels and stained with silver nitrate. (B) 1D lectin blots of the ES and TG extracts: lectins GNA, SNA, MAA, DSA, PNA, WFA, LTA and UEA-I were used as probes. The arrow indicates the band not abolished in the inhibitory assays.

bands on both the ES and TG, showing that the Fuc α 1-3GlcNAc motif is abundantly expressed on the glycoproteins of both extracts. The binding of GNA, WFA, LTA and UEA-I to those glycoproteins was inhibited by the corresponding monosaccharide, except in the case of a broad band of 55 kDa revealed by GNA on TG, which did not disappear in the inhibition experiment (not shown); furthermore, no reactive bands were observed when the ES and TG were probed directly with avidin-peroxidase alone.

3.2. 2D lectin blots and identification of lectin-binding proteins of the ES and TG extracts

Both extracts were re-screened by 2D lectin blotting but using only the lectins that gave positive reactions in the 1D blotting, i.e., GNA, WFA, LTA and UEA-I.

The ES extract resolved into approximately 400 spots, whose *pI*s and *MW*s ranged between pH 5–9 and 15–190 kDa (Fig. 2(A) and (B)). LTA bound to 176 of these spots, which were distributed between pH 5–9 and

32–190 kDa (Fig. 2(C) and (D)). By contrast, GNA (Fig. 2(E) and (F)) and WFA (Fig. 2(G) and (H)) bound to only 20–25 spots, most of which were located between pH 5–5.7 and 46–190 kDa. Matching of the lectin blots with their homologous silver-stained gels allowed us to localize in the 2D gels a total of 55 of those spots recognized by the lectins (Fig. 2). These 55 spots were cut from the gels and subjected to MS analysis. Table 2 shows the MS analysis results. Thirty-four spots out of 55 were identified and these 34 spots corresponded to eight different glycoproteins, one from the host (pre-pro serum albumin) and seven from the parasite: surface protein-fluke (SPF), ATP:guanidino kinase (ATPGK), serine protease inhibitor (serpin), enolase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FbisPA), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and cathepsin B endopeptidase (CBendo). For each protein we identified between two and nine isoforms. Lectin LTA bound to all these ES glycoproteins except serpin and low *MW* SPF isoforms. On the other hand, lectin GNA bound to serpin and all SPF isoforms and

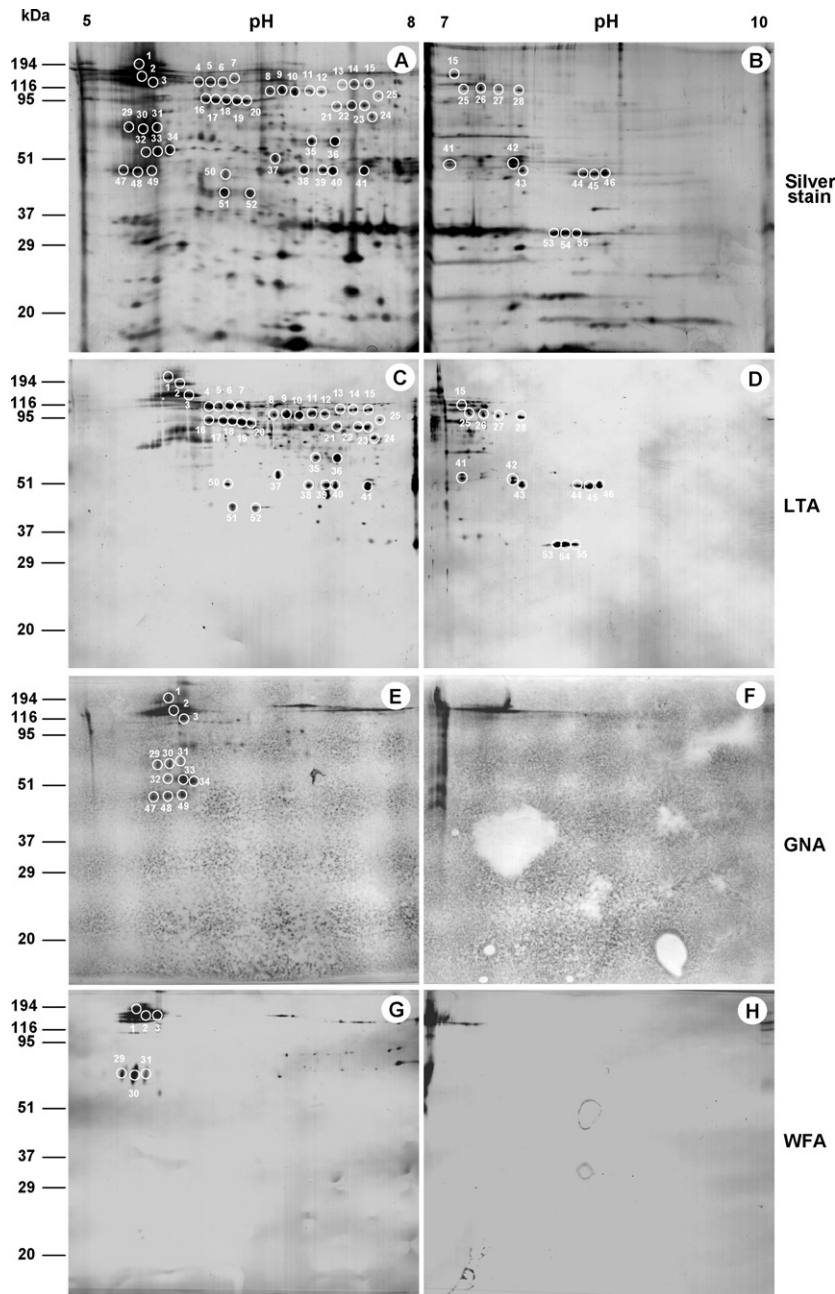


Fig. 2. Two-dimensional images of the ES extract. (A and B) Silver-stained 12% polyacrylamide gels with pH ranges of 5–8 and 7–10. Two-dimensional lectin blots in the pH 5–8 and 7–10 ranges with LTA (C and D), GNA (E and F) and WFA (G and H). Numbered circles indicate the lectin-binding spots, which were analyzed by mass spectrometry.

lectin WFA bound to serpin and high MW SPF isoforms.

The TG extract resolved in more than 600 spots, whose pIs and MWs ranged between pH 5–9.5 and 15–160 kDa (Fig. 3(A) and (B)). LTA bound to approximately 167 of these spots, which were distributed between pH 5.9–9.5 and 44–98 kDa (Fig. 3(C) and (D)).

Lectin UEA-I bound to almost the same spots as LTA (Fig. 3(E) and (F)). Matching of the LTA and UEA-I blots with the homologous silver-stained gels allowed us to localize 38 lectin-binding spots in the 2D gels (Fig. 3). These spots were cut from the gels and subjected to mass spectrometry analysis. As can be seen in Table 3, 20 spots out of 38 were identified that

Table 2

Identification by MALDI-TOF–TOF MS and NCBI database searching of the ES proteins revealed by lectins LTA, GNA and WFA (from Fig. 2)

Spot number	Lectin bound	Protein	Species	Accession number (NCBI)	MW (kDa) (theo/exp)	pI (theo/exp)	Cover. (%)	MASCOT score
1	LTA, GNA, WFA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/191	4.7/5.1	6	94
2	LTA, GNA, WFA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/153	4.7/5.2	5	84
3	LTA, GNA, WFA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/123	4.7/5.1	6	90
32	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/51	4.7/5.5	7	101
33	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/52	4.7/5.6	6	83
34	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/52	4.7/5.7	5	83
47	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/46	4.7/5.4	6	86
48	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/46	4.7/5.5	6	90
49	GNA	SPF	<i>S. mansoni</i>	T30271	191/47	4.7/5.6	7	101
16	LTA	Pre-proSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.0	19	120
17	LTA	Pre-proSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.1	13	84
18	LTA	Pre-proSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/89	5.8/6.2	14	96
19	LTA	Pre-proSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/88	5.8/6.62	16	105
20	LTA	Pre-proSA	<i>Ovis aries</i>	NP_001009376	71/88	5.8/6.3	19	120
25	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/93	8.1/7.3	19	120
26	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/93	8.1/7.4	34	208
27	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/92	8.1/7.6	12	112
28	LTA	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/92	8.1/7.8	19	120
29	GNA, WFA	serpin ^a	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/66	4.9/5.4	–	47
30	GNA, WFA	serpin ^a	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/65	4.9/5.5	–	49
31	GNA, WFA	serpin ^b	<i>S. haematobium</i>	AAA19730	44/66	4.9/5.6	19	88
35	LTA	Enolase ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/57	6.2/6.9	10	111
36	LTA	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/57	6.2/7.1	17	113
38	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/6.8	49	225
39	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.0	17	99
40	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.1	49	225
41	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.4	51	228
42	LTA	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.7	51	230
43	LTA	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.8	21	90
44	LTA	GAPDH ^b	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	21	115
45	LTA	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.5	17	81
46	LTA	GAPDH ^b	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.6	17	134
51	LTA	CBendo	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.2	21	88
52	LTA	CBendo	<i>S. mansoni</i>	CAC85211	40/41	5.7/6.4	19	86

SPF, surface protein-fluke; Pre-proSA, pre-pro serum albumin; ATPGK, ATP:guanidino kinase; serpin, serine protease inhibitor; FbisPA, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CBendo, cathepsin B endopeptidase.

^a Spots unidentified using PMF data but identified using MS/MS data.

^b Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.

corresponded to five different parasite glycoproteins: ATPGK, enolase, actin, FbisPA and GAPDH. For each glycoprotein we identified between two and seven isoforms. All these isoforms, except those of actin, which only fixed LTA, were bound by both lectins: LTA and UEA-I.

Overall, we identified eight parasite glycoproteins: four of them (ATPGK, enolase, FbisPA and GAPDH) were found in both extracts; another three (SPF, serpin and CBendo) were found only in the ES extract, and the remaining one, actin, was found only in the TG extract. All these glycoproteins except serpin fixed LTA, which indicates that they all carry the Fuc α 1-3GlcNAc motif. In contrast, only serpin and the high MW isoforms of

SFP fixed GNA and WFA, indicating that these proteins are the ones that carry glycans containing terminal mannosyl residues and LDN. Finally, only the TG isoforms of ATPGK, enolase, FbisPA and GAPDH fixed UEA-I, showing that only these isoforms contain the Fuc α 1-2Gal β terminal sequence on their glycans.

3.3. Western blots on ES and TG extracts with anti-KLH, anti-Le^X and anti-Le^Y

Fig. 4(A) shows that the anti-KLH antibody did not recognize any band on the ES or TG, which indicates that the F-LDN(-F) epitopes are not expressed on ES and TG glycoproteins of adult worms.

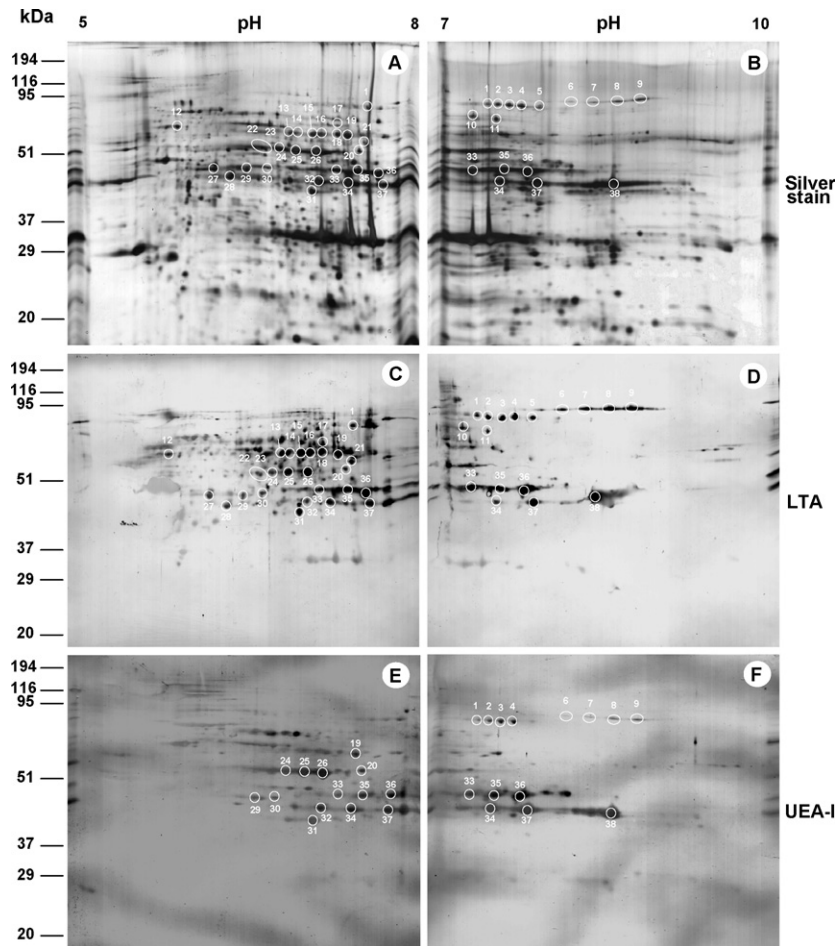


Fig. 3. Two-dimensional images of the TG extract. (A and B) Silver-stained 12% polyacrylamide gels with pH ranges of 5–8 and 7–10. Two-dimensional lectin blots in the pH 5–8 and 7–10 ranges with LTA (C and D) and UEA-I (E and F). Numbered circles indicate the LTA- and UEA-I-binding spots, which were analyzed by mass spectrometry.

On the other hand, the anti- Le^X and anti- Le^Y monoclonal antibodies did not recognize any band on the ES extract, but they both recognized bands on the TG extract and, in fact, they recognized essentially the same ones: a band of 44 kDa and, less intensely, a band of nearly 92 kDa (Fig. 4(A)).

3.4. Immunoprecipitation and identification of the Le^X - and Le^Y -bearing glycoproteins from the TG

Fig. 4(B) shows that both monoclonal antibodies were efficiently coupled to protein G-Sepharose 4B, and that no protein of TG bound directly to protein G-Sepharose 4B. Consequently, we incubated the TG with the anti- Le^X and anti- Le^Y antibodies coupled to protein G-Sepharose 4B and examined the results of the immunoprecipitation by SDS-PAGE. Fig. 4(C) shows that both antibodies captured the two bands of 44 and

92 kDa previously revealed by Western blotting. Then, both IP pellets were subjected to 2D electrophoresis and in both cases we observed the same result (Fig. 4(D)). Both bands of 92 kDa separated into three tiny spots each (spot nos. 1–3 and 9–11) and both bands of 44 kDa separated into five spots each (spot nos. 4–8 and 12–16). All these spots were cut from the gels and identified by MS analysis. Table 4 shows that spot nos. 1–3 and 9–11 were identified as ATPGK and that spot nos. 4–8 and 12–16 were identified as GAPDH.

3.5. Presence of antibodies against Le^X , Le^Y and F-LDN(-F) in the sera of *S. bovis*-infected sheep

The three *S. bovis*-infected sheep analysed developed very similar antibody responses. They all showed high levels of IgG and IgM anti-ES (Fig. 5(A) and (B)) and moderate levels of IgG and IgM anti-TG (Fig. 5(C)

Table 3

Identification by MALDI-TOF–TOF MS and NCBI database searching of the TG proteins revealed by the lectins LTA and UEA-I (from Fig. 3)

Spot number	Lectin bound	Protein	Species	Accession number (NCBI)	MW (kDa) (theo/exp)	pI (theo/exp)	Cover. (%)	MASCOT score
2	LTA, UEA-I	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/90	8.1/7.7	19	120
3	LTA, UEA-I	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/90	8.1/7.8	34	208
4	LTA, UEA-I	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/89	8.1/8.0	12	112
22	LTA, UEA-I	Enolase ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/6.7	22	90
23	LTA, UEA-I	Enolase ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/6.7	10	111
24	LTA, UEA-I	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/6.8	14	97
25	LTA, UEA-I	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/58	6.2/7.0	16	86
26	LTA, UEA-I	Enolase	<i>S. japonicum</i>	P33676	48/58	6.2/7.2	24	125
29	LTA, UEA-I	Enolase ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.6	–	61
30	LTA, UEA-I	Enolase ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.8	–	82
27	LTA	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/48	5.5/6.2	29	152
28	LTA	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/46	5.5/6.4	18	113
33	LTA, UEA-I	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/48	7.4/7.4	51	228
35	LTA, UEA-I	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/48	7.4/7.6	17	99
36	LTA, UEA-I	FbisPA	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/48	7.4/7.7	51	230
31	LTA, UEA-I	GAPDH ^b	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/42	7.7/7.1	–	107
32	LTA, UEA-I	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.2	22	119
34	LTA, UEA-I	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.6	17	81
37	LTA, UEA-I	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.8	21	90
38	LTA, UEA-I	GAPDH ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	21	115

ATPGK, ATP:guanidino kinase; FbisPA, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

^a Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.^b Spots unidentified using PMF data but identified using MS/MS data.

and (D)). The IgG anti-ES had reached maximum levels by the 8th week post-infection (w.p.i.) whereas the IgM anti-ES reached maximum levels early on, by the 4th w.p.i.; after that, the levels of both isotypes remained relatively constant until the sacrifice of sheep, in the 24th w.p.i. By contrast, the levels of both IgG and IgM anti-TG antibodies underwent a slow but constant increase from week 0 to week 24 p.i.

High levels of anti-KLH antibodies were also detected in the infected sheep (Fig. 5(E) and (F)). Anti-KLH IgG levels peaked by weeks 4–8 and remained high up to week 24. Anti-KLH IgM levels peaked by week 4 and decreased to a minimum by weeks 8–12; after that time, they increased slightly up to week 24.

Moderate to high levels of anti-Le^X antibodies were present in all the infected sheep (Fig. 5(G) and (H)). Anti-Le^X IgG levels peaked between weeks 4 and 8 and then decreased but remained detectable until week 24. Anti-Le^X IgM levels peaked by week 4 and decreased slightly, although within a moderate range, until week 24.

Moderate levels of anti-Le^Y antibodies were also present in all the sheep analyzed (Fig. 5(I) and (J)). The anti-Le^Y response was very similar to the anti-TG response; i.e., the levels of both anti-Le^Y antibody

isotypes, IgG and IgM, increased slowly but constantly from week 0 to week 24 p.i. At the time of sacrifice, the levels of anti-Le^Y antibodies reached values two- to three-fold higher than the pre-infection level.

4. Discussion

We started the characterization of the glycans of the ES and TG with a simple 1D lectin blotting, which provided us with information about the type of terminal sugar sequence present – or absent – on the ES and TG glycoproteins, thus guiding us in later analyses (Fig. 1(B)).

Not surprisingly, the 1D lectin blot confirmed the absence of sialic acid residues on the ES and TG glycoproteins of *S. bovis*. This finding is consistent with the fact that the sialic acid is lacking in schistosome glycans in general (Nyame et al., 1998).

The 1D lectin blot indicated that the ES and TG glycoproteins also lacked the carbohydrate motifs recognized by lectins PNA (Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr) and DSA (LacNAc, GlcNAc-Ser/Thr). The absence of these motifs from adult *S. bovis* ES and TG glycoproteins, however, does not rule out their presence on proteins from other parts of adult worms or even other developmental stages of *S. bovis*. In fact, Galβ1-

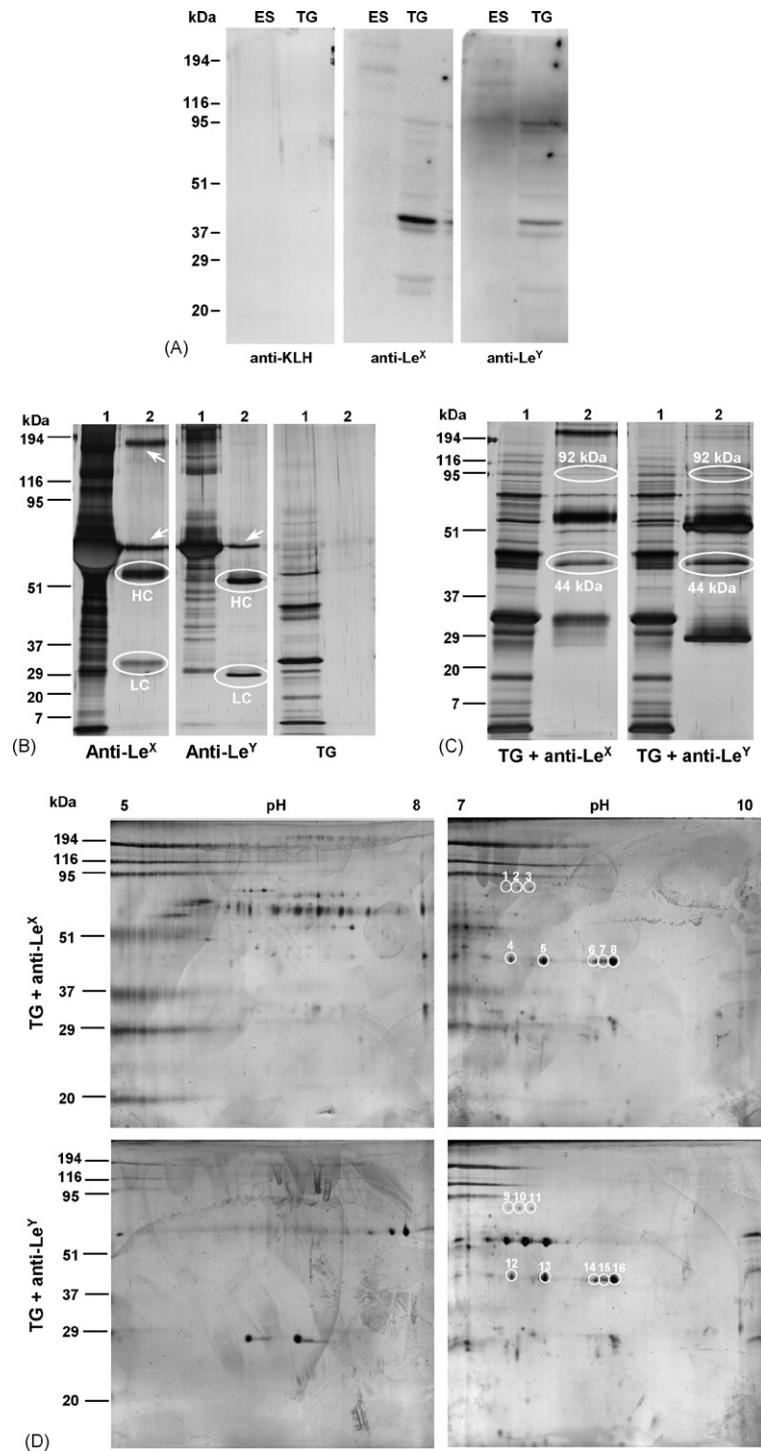


Fig. 4. (A) 1D Western blots of the ES and TG immunostained with the polyclonal anti-KLH antibody (developed with 4-Cl-1-naphthol) or the anti-Le^X and anti-Le^Y monoclonal antibodies (developed with luminol). (B) Silver-stained SDS-PAGE of the supernatants (1) and pellets (2) of the coupling reaction of anti-Le^X and anti-Le^Y mAb, and TG to protein G-Sepharose 4B. HC, mAb heavy chains; LC, mAb light chains. Arrows indicate contaminants also bound by protein G. (C) Silver-stained SDS-PAGE of the supernatants (1) and pellets (2) from the immunocapture of TG proteins with the mAb coupled to protein G-Sepharose 4B. The immunocaptured bands are circled and annotated with their apparent MW. (D) Images of the immunoprecipitation pellets after 2D electrophoresis in gels of 12% polyacrylamide and pH ranges of 5–8 and 7–10. Numbered circles indicate the spots corresponding to the immunocaptured proteins, which were analyzed by mass spectrometry.

Table 4

Identification by MALDI-TOF–TOF MS and NCBI database searching of the TG proteins that contain Le^X and Le^Y groups (from Fig. 4)

Spot number	Protein	Species	Accession number (NCBI)	MW (kDa) (theo/exp)	pI (theo/exp)	Cover. (%)	MASCOT score
1, 9	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/90	8.1/7.7	19, 21	120, 123
2, 10	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/99	8.1/7.8	30, 34	201, 208
3, 11	ATPGK	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/89	8.1/8.0	12, 16	112, 118
4, 12	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.6	22, 27	100, 115
5, 13	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.9	21, 26	90, 115
6, 14	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.3	23, 25	115, 115
7, 15	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.4	15, 17	78, 81
8, 16	GAPDH	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.5	28, 29	134, 139

ATPGK, ATP:guanidino kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

3GalNAc-Ser/Thr and GlcNAc-Ser/Thr have been found in *S. mansoni* on glycoproteins from homogenates of whole adult worms and schistosomula (Nyame et al., 1987, 1988); in addition, unusual O-glycans that terminate with GlcNAc or LacNAc have been described to occur on the *S. mansoni* cercarial glycocalyx (Huang et al., 2001).

Lectin GNA did not recognize any glycoprotein on the TG extract, but it recognized two glycoproteins on the ES extract that were later identified as surface protein-fluke (SPF) and serine protease inhibitor (serpin) (Fig. 2(E) and Table 2). Since GNA indicates the presence of terminal mannose residues on “high mannose” and “complex”-type N-glycans, it is reasonable to speculate that the *S. bovis* SPF and serpin would carry this kind of N-glycans. Complex N-glycans contain the so-called chitobiose core (Man₃GlcNAc₂), which is common to all eukaryotes. Recently, complex N-glycans in which the chitobiose core was partially substituted by the so-called core β2-xylose (Man₃(Xyl)-R) and core α3-fucose (Fucα1-3GlcNAc) have been detected in *S. mansoni* excreted/secreted products of schistosomula, adults, and eggs (Faveeuw et al., 2003). Moreover, these N-glycans are very antigenic and induce strong Th2 responses (Faveeuw et al., loc. cit.). Since the *S. bovis* SPF and serpin glycoproteins are also strongly antigenic and very abundant in the ES extract (Pérez-Sánchez et al., 2006), it is tempting to surmise that they could carry complex N-glycans similar to those described in *S. mansoni*. Evidently, however, demonstration of this hypothesis would require detailed carbohydrate structural analyses.

Regarding the SPF isoforms (Table 2), the broad range of MWs (47–191 kDa) exhibited by them is noteworthy. Although some degree of proteolysis cannot be ruled out, a better explanation for this phenomenon could be differences in the degree and type of glycosylation among isoforms. In fact, while all the

SPF isoforms were recognized by GNA, those with the highest MW were also recognized by lectins WFA and LTA (Table 2), indicating the presence of additional glycan decorations that, in turn, may account for the increase in the MW of those isoforms.

The positive reaction with lectin WFA suggest that LDN (GalNAcβ1-4GlcNAcβ1) is expressed by *S. bovis* (Fig. 2(G)). LDN is an antigenic motif abundantly expressed by schistosomes, but also by humans and probably by many other mammals (Hokke and Yazdanbakhsh, 2005). In *S. mansoni*, LDN is expressed by cercariae, schistosomula, adults, and eggs, and it is localized on the surface of all vertebrate stages analyzed (Nyame et al., 2003). We found two WFA-binding glycoproteins – SFP and serpin (Table 2) – that were both present in the ES extract but not in the TG extract. Although these two glycoproteins have been reported to be tegument-associated proteins (Abath and Werkhauser, 1996), their presence in the ES extract can be explained by the shedding of tegument components to the incubation medium during preparation of the ES extract. In fact, this phenomenon was not surprising because according to Cutts and Wilson (1997) the ES extract contains not only the vomitus of the parasite but also the components that are released from the tegument.

Lectin LTA binds to the Fucα1-3GlcNAc glycan motif. This motif can be found forming part of several glycans that are abundantly expressed on the glycoproteins of schistosomes, such as LDN-F, F-LDN-F and Le^X (Nyame et al., 2003; Robijn et al., 2005). Other glycans that also contain this motif are Le^Y and pseudo-Le^Y (Fucα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1). Le^Y has never been found in schistosomes (Nyame et al., 1998) but pseudo-Le^Y has been found in schistosome cercarial glycolipids (Wuhrer et al., 2000; Meyer et al., 2005).

Thus, given the ample range of glycans that could be bound by the lectin LTA and the fact that many of these glycans are present in schistosome glycoproteins, the

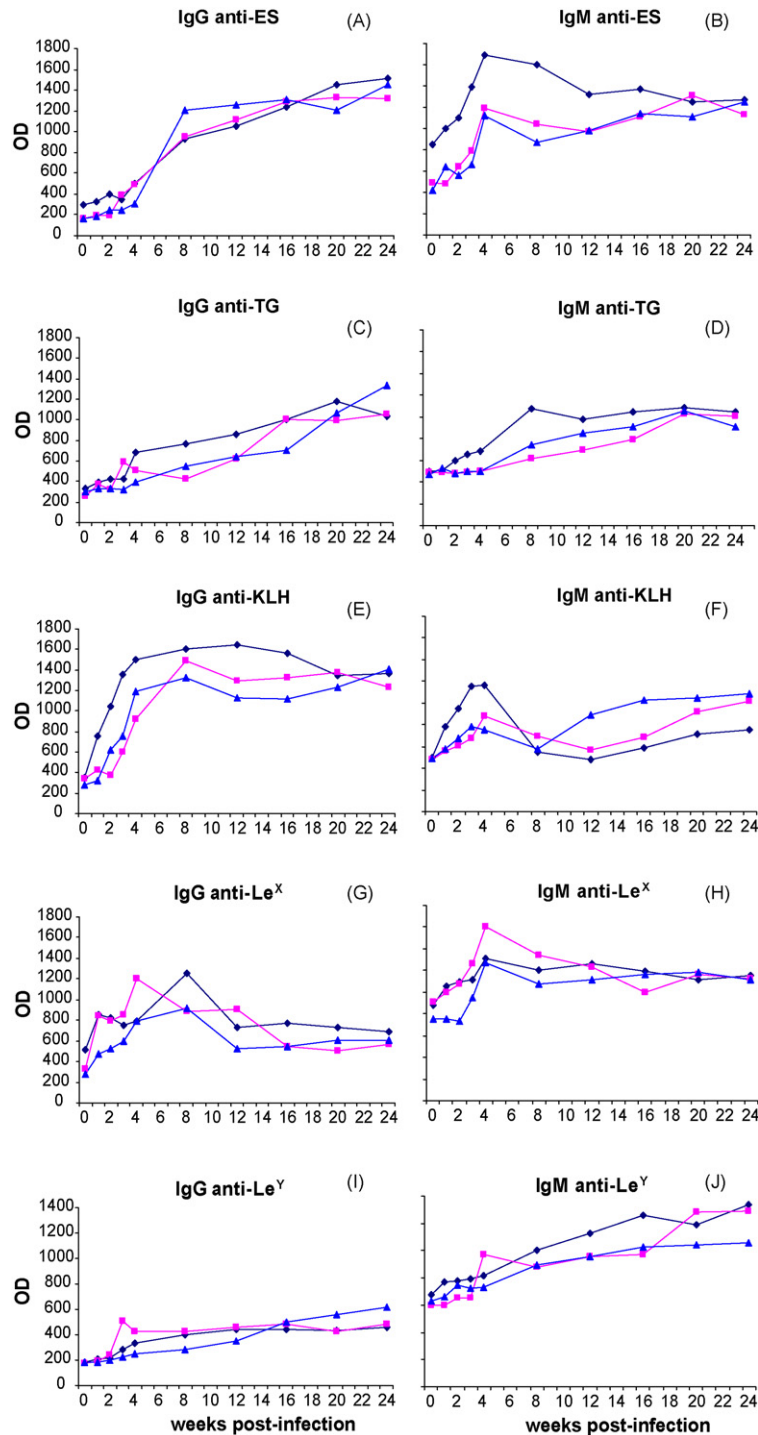


Fig. 5. ELISA. IgG and IgM antibody responses to ES, TG, KLH and the neoglycoproteins BSA–LNFPIII (Le^x) and BSA– Le^y in three sheep infected with *S. bovis*. Each series of points represents an individual sheep. The plots are typical of three experiments.

high number of bands that were recognized by LTA in the adult *S. bovis* ES and TG extracts (Fig. 1(B)) was not unexpected. Very similar band profiles have been revealed by lectin LTA on Triton X-100 extracts from

whole *S. haematobium* and *S. japonicum* adult worms (Nyame et al., 1998), which suggests strong similarities among the fucosylated glycoproteins of adult *S. bovis*, *S. haematobium* and *S. japonicum* worms.

Regarding the identification of the LTA-binding fucosylated glycoproteins of adult *S. bovis* worms, the analysis by mass spectrometry of a fraction of the LTA-binding spots allowed us to identify seven glycoproteins: SPF, ATPGK, enolase, FbisPA, GAPDH, CBendo and actin. All of them except SPF, CBendo and actin were present in both extracts. This is consistent with the findings of previous works (Pérez-Sánchez et al., 2006), except for GAPDH and FbisPA, which were only found in the TG extract.

Moreover, not all these LTA-binding glycoproteins were antigenic. Only the high-MW SPF isoforms, enolase, GAPDH and CBendo were antigenic (Pérez-Sánchez et al., loc. cit.), suggesting that there is no direct relationship between the presence of the Fuc α 1-3GlcNAc motif in *S. bovis* glycoproteins and the antigenicity of these glycoproteins. In fact, the glycans that contain only this kind of fucosylated motif, such as LDN-F and Le^X, generally induce weak antibody responses, although they may have immunomodulatory effects (Robijn et al., 2005). By contrast, glycans containing the Fuc α 1-3GalNAc β 1- or Fuc α 1-2Fuc α 1-motifs, such as F-LDN(-F) and (DF-)LDN-DF, induce strong antibody responses in human and primate schistosomiasis (Van Remoortere et al., 2003; Robijn et al., 2005; Wuhler et al., 2006b). Bearing this in mind, we analysed whether the ES and TG glycoproteins of adult *S. bovis* worms carried F-LDN(-F) and Le^X. Additionally, since Le^Y also contains the LTA-binding motif Fuc α 1-3GlcNAc we also checked the presence of Le^Y in those glycoproteins.

It is well established that KLH and schistosomes share the carbohydrate epitopes F-LDN(-F) (Geyer et al., 2005); this is indeed why we used an anti-KLH polyclonal antibody as a probe in the search for F-LDN(-F)-containing glycans in *S. bovis*. The 1D Western blots with anti-KLH clearly showed that the F-LDN(-F) epitopes were absent from the adult ES and TG glycoproteins (Fig. 4(A)). This antibody, however, recognized numerous bands on extracts of glycoproteins from the cercariae and eggs of *S. bovis* (personal observation, data not shown). These results suggest that *S. bovis* expresses F-LDN(-F) on cercarial and egg glycoproteins but not on adult worm glycoproteins, in agreement with the results described for *S. mansoni* by Robijn et al. (2005). These authors also reported that *S. mansoni* expresses F-LDN(-F) on glycolipids of cercariae, adults and eggs. Accordingly, it is possible that *S. bovis* might also express F-LDN(-F) on its glycolipids, although here this point was not assessed. In any case, the fact that *S. bovis* expresses F-LDN(-F), at least in its cercarial and egg glycoproteins, is also

supported by the strong IgG and IgM antibody responses against KLH that we observed in all the sheep infected with *S. bovis* (Fig. 5(E) and (F)).

In the search for Le^X- and Le^Y-bearing glycoproteins within the adult worm ES and TG extracts we obtained some remarkable results (Fig. 4(C) and (D) and Table 4). First, we found Le^X in *S. bovis*, as was expected in view of its abundant expression in the *Schistosoma* genus (Nyame et al., 1998; Hokke and Yazdanbakhsh, 2005). However, we also found Le^Y and this observation was somewhat surprising because this glycan has never been recorded in the genus *Schistosoma*. In this sense, Nyame et al. (1998) elegantly demonstrated the absence of Le^Y, Le^b (Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1) and Le^a (Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1) in the *Schistosoma* species that infect humans.

Second, we found both the Le^X and Le^Y antigens in the TG but not in the ES extract. This is in agreement with the observation that Le^X is expressed by other schistosomes on their tegument surface (Nyame et al., 2003). Nevertheless, we found both Lewis antigens in two glycoproteins, ATPGK and GAPDH, that were present in both the ES and TG extracts, suggesting that the ATPGK and GAPDH isoforms present in the ES extract do not express Lewis groups.

Third, in the TG extract the two anti-Lewis monoclonal antibodies recognized exactly the same isoforms of ATPGK and GAPDH. This finding, together with the well-established absence of Le^Y in the human-infecting schistosomes, suggested that we might be facing a problem of cross-reactivity between both monoclonal antibodies, such that the anti-Le^Y antibody would be recognizing the Le^X antigen. However, we ruled out this possibility because both antigens (Le^X and Le^Y) are quite different and, above all, because we observed by means of an inhibition ELISA – using the neoglycoproteins BSA-LNFP III and BSA-Le^Y – that there were no cross-reactivity at all between both monoclonal antibodies (data not shown). Consequently, the presence of Le^Y on these two *S. bovis* glycoproteins appeared to be real. In addition, we observed antibody responses against both the Le^X and Le^Y epitopes in all the sheep infected with *S. bovis* (Fig. 5(G)–(J)). The existence of these humoral responses and the different kinetics of the anti-Le^X and anti-Le^Y antibodies reinforced the idea that *S. bovis* actually expresses these two different Lewis antigens. Finally, the spot pattern recognized by lectin UEA-I on the TG extract also supported this idea. As can be seen in Fig. 3(F), the ATPGK and GAPDH isoforms that were recognized by the anti-Le^Y monoclonal antibody were also bound by

lectin UEA-I, which confirms that they carry the Fuc α 1-2Gal β 1-motif, which, in turn, forms part of the Le^Y antigen.

Overall, these results indicate that both the Le^X and Le^Y antigens are co-expressed on the same isoforms of ATPGK and GAPDH by adult *S. bovis* worms, although definitive demonstration of this point requires detailed structural analyses.

Regarding the possible biological significance of this fact, some data recently published in relation to the Lewis antigens could provide some clues. It has been demonstrated that the Lewis antigens Le^X, Le^a, Le^b and Le^Y bind to the host lectin DC-SIGN through the amino acid Val³⁵¹ (see Meyer et al., 2005). It has also been shown that DC-SIGN also binds to pseudo-Le^Y, a glycan antigen that so far only has been found within schistosomes, in particular on cercarial glycolipids from *S. mansoni* (see Meyer et al., 2005). DC-SIGN is a C-type lectin expressed on the surface of dendritic cells, which in a concerted action with Toll-like receptors determine the balance in dendritic cells between the induction of immunity and tolerance against a particular antigen. It has been hypothesized that the binding of parasite Le^X and pseudo-Le^Y to host DC-SIGN may allow schistosomes to mislead the host immune system by down-regulating dendritic cell function in all stages of infection (Meyer et al., loc. cit). Perhaps this hypothesis could also be applied to the Le^X and Le^Y expressed by *S. bovis*.

In conclusion, the identification in *S. bovis* of all these glycans and carrier proteins provides new and exciting perspectives for future studies on the biological roles of these molecules in host–*S. bovis* relationships, and, perhaps, for their potential use as diagnostic or vaccine antigens.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Emilio Camafeita Fernández from the Proteomic Unit of the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares of Madrid (Spain) for his assistance in mass spectrometry analyses and N. Skinner for supervising the English version of this manuscript. This research was supported by grant AGL2003-04235 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

References

Abath, F.G., Werkhauser, R.C., 1996. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunol.* 18, 15–20.

- Agnew, A.M., Murare, H.M., Lucas, S.B., Doenhoff, M.J., 1989. *Schistosoma bovis* as an analogue of *S. haematobium*. *Parasite Immunol.* 11, 329–340.
- Boulanger, D., Schneider, D., Chippaux, J.P., Sellin, B., Capron, A., 1999. *Schistosoma bovis*: vaccine effects of a recombinant homologous glutathione *S*-transferase in sheep. *Int. J. Parasitol.* 29, 415–418.
- Cutts, L., Wilson, R.A., 1997. The protein antigens secreted in vivo by adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 114, 245–255.
- De Bont, J., Vercruysse, J., 1998. Schistosomiasis in cattle. *Adv. Parasitol.* 41, 285–364.
- De Bont, J., Claerebout, E., Riveau, G., Schacht, A.M., Smets, K., Conder, G., Brake, D.A., Capron, A., Vercruysse, J., 2003. Failure of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione *S*-transferase to protect cattle against experimental *Fasciola hepatica* infection. *Vet. Parasitol.* 113, 135–144.
- Faveeuw, C., Mallevaey, T., Paschinger, K., Wilson, I.B., Fontaine, J., Mollicone, R., Oriol, R., Altmann, F., Lerouge, P., Capron, M., Trottein, F., 2003. Schistosome N-glycans containing core alpha 3-fucose and core beta 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice. *Eur. J. Immunol.* 33, 1271–1281.
- Geyer, H., Wuhler, M., Resemann, A., Geyer, R., 2005. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 280, 40731–40748.
- Gray, G.R., 1974. The direct coupling of oligosaccharides and derivatized gels. *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 426–428.
- Harlow, E., Lane, D. (Eds.), 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, pp. 551–554.
- Hokke, C.H., Deelder, A.M., 2001. Schistosome glycoconjugates in host–parasite interplay. *Glycoconj. J.* 18, 573–587.
- Hokke, C.H., Yazdanbakhsh, M., 2005. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol.* 27, 257–264.
- Huang, H.H., Tsai, P.L., Khoo, K.H., 2001. Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of *Schistosoma mansoni* cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X structure. *Glycobiology* 11, 395–406.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Loukas, A., Jones, M.K., King, L.T., Brindley, P.J., McManus, D.P., 2001. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infect. Immun.* 69, 3646–3651.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D., Selkirk, M.E., 1991. *Parasite Antigen Parasite Genes: A Laboratory Manual for Molecular Parasitology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Meyer, S., van Liempt, E., Imberty, A., van Kooyk, Y., Geyer, H., Geyer, R., van Die, I., 2005. DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-Lewis^Y glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. *J. Biol. Chem.* 280, 37349–37359.
- Moné, H., Mouahid, G., Morand, S., 1999. The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc–parasite relationships. *Adv. Parasitol.* 4, 9–138.
- Nyame, A.K., Cummings, R.D., Damian, R.T., 1987. *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues. *J. Biol. Chem.* 262, 7990–7995.
- Nyame, A.K., Cummings, R.D., Damian, R.T., 1988. Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins

- synthesized by *Schistosoma mansoni* schistosomula. J. Parasitol. 74, 562–572.
- Nyame, A.K., Pilcher, J.B., Tsang, V.C., Cummings, R.D., 1996. *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le(x) determinants on myeloid cells. Exp. Parasitol. 82, 191–200.
- Nyame, A.K., Debose-Boyd, R., Long, T.D., Tsang, V.C., Cummings, R.D., 1998. Expression of LeX antigen in *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* and immune responses to LeX in infected animals: lack of LeX expression in other trematodes and nematodes. Glycobiology 8, 615–624.
- Nyame, A.K., Lewis, F.A., Doughty, B.L., Correa-Oliveira, R., Cummings, R.D., 2003. Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. Exp. Parasitol. 104, 1–13.
- Nyame, A.K., Kwar, Z.S., Cummings, R.D., 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. Arch. Biochem. Biophys. 426, 182–200.
- Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2006. Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics 6, 226–236.
- Robijn, M.L., Wuhler, M., Kornelis, D., Deelder, A.M., Geyer, R., Hokke, C.H., 2005. Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, adult worms and eggs. Parasitology 130, 67–77.
- Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68, 850–858.
- Stochaj, W.R., Berkelman, T., Laird, N., 2003. Preparative two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients. In: Simpson, R.J. (Ed.), Proteins and Proteomics A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 143–218.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. Anal. Bioanal. Chem. 376, 952–965.
- Trottein, F., Godin, C., Pierce, R.J., Sellin, B., Taylor, M.G., Gorillot, I., Silva, M.S., Lecocq, J.P., Capron, A., 1992. Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. Mol. Biochem. Parasitol. 54, 63–72.
- Van de Vijver, K.K., Deelder, A.M., Jacobs, W., Van Marck, E.A., Hokke, C.H., 2006. LacdiNAc- and LacNAc-containing glycans induce granulomas in an in vivo model for schistosome egg-induced hepatic granuloma formation. Glycobiology 16, 237–243.
- Van Liempt, E., Imberty, A., Bank, C.M., Van Vliet, S.J., Van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B., Van Die, I., 2004. Molecular basis of the differences in binding properties of the highly related C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN to Lewis X trisaccharide and *Schistosoma mansoni* egg antigens. J. Biol. Chem. 279, 33161–33167.
- Van Remoortere, A., Vermeer, H.J., van Roon, A.M., Langermans, J.A., Thomas, A.W., Wilson, R.A., van Die, I., van den Eijnden, D.H., Agoston, K., Kerekgyarto, J., Vliegthart, J.F., Kamerling, J.P., van Dam, G.J., Hokke, C.H., Deelder, A.M., 2003. Dominant antibody responses to Fucalpha1-3GalNAc and Fucalpha1-2Fucalpha1-3GlcNAc containing carbohydrate epitopes in Pan troglodytes vaccinated and infected with *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 105, 219–225.
- Vercruysse, J., Gabriel, S., 2005. Immunity to schistosomiasis in animals: an update. Parasite Immunol. 27, 289–295.
- Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M., Lochnit, G., Geyer, R., 2000. *Schistosoma mansoni* cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. Glycobiology 10, 89–101.
- Wuhrer, M., Balog, C.I., Catalina, M.I., Jones, F.M., Schramm, G., Haas, H., Doenhoff, M.J., Dunne, D.W., Deelder, A.M., Hokke, C.H., 2006a. IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. FEBS J. 273, 2276–2292.
- Wuhrer, M., Koeleman, C.A., Deelder, A.M., Hokke, C.H., 2006b. Repeats of LacdiNAc and fucosylated LacdiNAc on N-glycans of the human parasite *Schistosoma mansoni*. FEBS J. 273, 347–361.

Schistosoma bovis: Plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument

Alicia Ramajo-Hernández¹, Ricardo Pérez-Sánchez¹, Vicente Ramajo-Martín, Ana Oleaga^{*}

Unidad de Patología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain

Received 2 May 2006; received in revised form 20 June 2006; accepted 14 July 2006

Available online 8 September 2006

Abstract

Schistosoma bovis is a ruminant haematic parasite that lives for years in the mesenteric vessels of the host. The aim of this work was to investigate the ability of adult *S. bovis* worms to interact with plasminogen, a central component in the host fibrinolytic system. Confocal microscopy analysis revealed that plasminogen bound to the tegument surface of the male—but not female—*S. bovis* worms and that this binding was strongly dependent on lysine residues. It was also observed that a protein extract of the worm tegument (TG) had the capacity to generate plasmin and to enhance the plasmin generation by the tissue-type plasminogen activator. Proteomic analysis of the TG extract identified 10 plasminogen-binding proteins, among which the major ones were enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin. This study represents the first report about the binding of plasminogen to *Schistosoma* sp. proteins.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Schistosoma bovis*; Tegument; Plasminogen binding; Proteome; Mass spectrometry; Confocal microscopy

1. Introduction

In many tropical and subtropical countries, schistosomes are one of the major causes of disease in humans and domestic animals (De Bont and Vercruysse, 1998; Mahmoud, 2001). *Schistosoma bovis* is a ruminant haematic parasite that lives in the portal mesenteric system of the host. It belongs to the same species complex as the human pathogen *Schistosoma haematobium* and indeed is an immunological analogue of *S. haematobium* (Agnew et al., 1989), which makes studies of *S. bovis* an attractive goal from the perspectives of both veterinary and comparative medicine.

Like human schistosomes, adult *S. bovis* worms live for years in the blood vessels of their definitive host without being removed by the host defensive systems (Pearce and MacDonald, 2002). It is known that schistosomes trigger potent immune responses in their hosts, but it is also apparent that they have evolved multiple strategies to

evade the host immune defence mechanisms (Abath and Werkhauser, 1996). It is reasonable to assume that in this intravascular habitat the parasite must interact not only with the immune system but also with the haemostatic system of the host. Notwithstanding, relatively few studies have investigated the interactions between schistosomes and elements of host haemostatic defence mechanisms. These studies have essentially focused on the interaction between the parasite and platelets (DeMarco et al., 2003; Stanley et al., 2003). In this sense, it has been observed that all developmental stages of *Schistosoma mansoni*, except the eggs, express ATPase activity on their tegument surface and that this ATPase activity would inhibit platelet activation (DeMarco et al., 2003). It has been also reported that infection with *S. mansoni* induces immune-dependent thrombocytopaenia (Stanley et al., 2003) and that this thrombocytopaenia could partially explain why blood clots do not form around adult worms (in Ruppel et al., 2002).

Another mechanism that could help to prevent clot formation could be activation of the fibrinolytic system, in which plasminogen plays a key role.

^{*} Corresponding author. Fax: +34 923219609.

E-mail address: oleaga@usal.es (A. Oleaga).

¹ These authors have equally contributed to this work.

Plasminogen is a single-chain glycoprotein with a molecular mass of about 92 kDa and it represents the monomeric proenzyme of the serine protease plasmin, which degrades fibrin and extracellular matrices (Plow et al., 1995). The binding of plasminogen to mammalian and bacterial cells is mediated by its five kringle domains, which have affinity for lysine residues, and in fact almost all plasminogen-receptor proteins so far identified have carboxy-terminal lysine residues (Plow et al., 1995).

Interactions with plasminogen have been observed in bacteria, fungi, protozoa and helminths. The interactions of some bacterial and fungal pathogens with the plasminogen-plasmin system have been the most studied, and in the case of group A Streptococci, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi* and *Candida albicans* the interaction with plasminogen has been shown to be involved in invasiveness within the host (Goguen et al., 2000; Lähdenmäki et al., 2001; Crowe et al., 2003). The protozoa *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi* have been reported to bind plasminogen and also to enhance the activation of plasminogen by tissue-type plasminogen activator (t-PA) (Avilan et al., 2000; Almeida et al., 2004). In helminths, two plasminogen-binding proteins have been identified: enolase in *Fasciola hepatica* and *Onchocerca volvulus* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *O. volvulus* (Jolodan et al., 2003; Bernal et al., 2004; Erttmann et al., 2005).

Since adult *S. bovis* worms live for years in the blood vessels of the host, it is reasonable to assume that this parasite would interact with the plasminogen-plasmin system as a way to prevent blood clotting around it. The parasite molecules that could potentially bind plasminogen would be those that the parasite exposes to the host during infection, such as the proteins expressed on its tegument surface.

Accordingly, the aims of this study were to investigate whether plasminogen binds to the tegument of adult *S. bovis* worms and to identify the proteins most likely involved in such binding.

Here, we demonstrate that plasminogen binds to the surface of male—but not female—worms and that an extract of tegument proteins induces the generation of plasmin on its own and also enhances the plasmin generation induced by t-PA. Finally, by mass spectrometry analysis, we identified in that extract 10 plasminogen-binding proteins, among which the biologically relevant receptors are presumably present.

2. Materials and methods

2.1. Maintenance of the *S. bovis* life cycle

A strain of *S. bovis* from Salamanca (Spain) was maintained in the laboratory in its natural hosts: *Planorbis metidjensis* snails and sheep. Each snail was infected with five miracidia from eggs obtained from experimentally infected sheep faeces. The sheep were infected percutaneously with 2000 *S. bovis* cercariae by submerging a fore-limb for 30 min in a suspension of these cercariae. At 6 months post-infection, the sheep were sedated with ketamine (10 mg/kg) and

then sacrificed by bleeding through the jugular vein. Adult *S. bovis* worms were recovered by dissection of the mesenteric vessels from the entire gut. The viability of the worms was examined microscopically, after which intact parasites were processed immediately to obtain the tegument extracts or for the analyses by confocal microscopy.

2.2. Preparation of tegument protein extract

A tegument protein extract (TG) was prepared from live adult worms according to the following procedure. The parasites were washed thoroughly in Tris-buffered saline (TBS) and incubated in 1% Triton X-100 in TBS at 4 °C with gentle shaking for 30 min. Following this, the incubation medium was recovered and a cocktail of protease inhibitors was added, as indicated by Maizels et al. (1991). After that, the extract was clarified by centrifugation at 10000g, dialyzed against water for 24 h, and concentrated by vacuum centrifugation to a concentration of >3 µg/µl. The protein concentration of the TG extract was measured by the method of Markwell et al. (1978).

2.3. Plasminogen binding to tegument proteins

To determine whether plasminogen would bind to the TG extract, an ELISA was performed. Multiwell plates (Sigma) were coated with 1 µg of TG protein per well diluted in carbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4 °C. Non-specific binding sites on the plates were blocked by incubation with 1% BSA in PBS (PBS-BSA). After washing with PBS containing 0.05% Tween 20, the wells were incubated with increasing amounts (from 0 to 3 µg) of human plasminogen (Acris antibodies) diluted in PBS-BSA. The wells were washed again and then incubated with 0.1 µg/well of a peroxidase-conjugated goat anti-human plasminogen IgG (Cedarlane Laboratories). All incubations were performed over 1 h at 37 °C. Ortho-phenylene-diamine was used as a chromogen substrate for peroxidase. In parallel, competition experiments were carried out by including 40 mM of the lysine analogue ε-aminocaproic acid (εACA) during plasminogen binding. All the multiwell plates included some control wells that were coated with BSA only (without TG).

2.4. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)

The TG extract was subjected to SDS–PAGE in 12% polyacrylamide gels according to the method described by Laemmli (1970) in a Mini Protean cell (Bio-Rad). Running proceeded at 15 mA/gel for the first 15 min and then at 30 mA/gel. After running, the gels were either stained with silver stain or electroblotted onto nitrocellulose membranes for ligand blot analysis.

2.5. Two-dimensional electrophoresis (2DE)

Isoelectric focusing (IEF) was performed in 7-cm immobilised pH gradient (IPG) strips (Bio-Rad) with linear pH ranges

of 5–8 and 7–10, at 50 μ A/strip, using a Protean IEF Cell (Bio-Rad). As observed by Pérez-Sánchez et al. (2006), in these pH ranges the TG components can be adequately resolved.

The TG samples, containing 25 μ g for 2D silver-stained gels or 40 μ g for 2D Western blotting, were diluted in 125 μ l of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 50 mM dithiothreitol (DTT), 0.2% IPG buffer of the respective pH gradient, and bromophenol blue) and allowed to mix gently for 1 h at room temperature before centrifugation for 30 min at 18000g to remove all particulate material. Supernatants were applied to the IPG strips by in-gel rehydration at 20 °C for at least 12 h, after which IEF were run for a total of 20,000 Vh.

After IEF, the strips were reduced in equilibration buffer (6 M urea, 0.05 M Tris, pH 8.8, 2% SDS and 20% glycerol) containing 2% DTT for 15 min and were then alkylated in equilibration buffer containing 2.5% iodoacetamide for 10 min. The second dimension was performed in 12% polyacrylamide gels.

The 2D gels were stained with a mass spectrometry compatible silver stain (Stochaj et al., 2003) and scanned using an Image Scanner (GE Healthcare).

2.6. Ligand blotting

Proteins were electrotransferred from 1D or 2D gels to nitrocellulose membranes at 400 mA for 90 min. The membranes were blocked with 3% BSA in TBS for 1 h at 37 °C, rinsed three times with washing buffer (TBS containing 0.05% Tween 20, TBST), and incubated overnight at 4 °C with 35 μ g/ml of human plasminogen diluted in TBST-25 mM EDTA-1% BSA. After four new washes, the blots were incubated for 1 h at 37 °C with 0.5 μ g/ml of the peroxidase-conjugated goat anti-human plasminogen IgG diluted in TBST-1% BSA. The 1D ligand blots were revealed with 4-chloro-1-naphthol. The 2D ligand blots were revealed with the Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) and their images were acquired with the Fluor-S Multimager system (Bio-Rad). Negative controls were also included in which the TG or the plasminogen had been omitted. These assays were performed three times.

2.7. Image analysis

Analysis of 2D gels and 2D Western blots was accomplished using ImageMaster 2D Platinum Software v5.0 (GE Healthcare). The 2D Western blots and their homologous silver-stained gels were aligned to isoelectric points (pI) and molecular weights (M_w) and then matched by ImageMaster software in order to identify the plasminogen-binding spots in the gels. Predicted matches were also verified visually.

2.8. Mass spectrometry (MS) and protein identification

These analyses were carried out as described in Pérez-Sánchez et al. (2006). Protein spots were excised manually

and then digested automatically using a Proteiner DP protein digestion station (Bruker-Daltonics). The digestion protocol used was that of Schevchenko et al. (1996). For peptide mass fingerprinting and LIFT TOF/TOF (Suckau et al., 2003) spectra acquisition, an aliquot of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 33% aqueous acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid was mixed with an aliquot of the above digestion solution and the mixture was deposited onto an AnchorChip MALDI probe (Bruker-Daltonics).

Peptide mass fingerprint spectra were measured on a Bruker Ultraflex TOF/TOF MALDI mass spectrometer (Bruker-Daltonics) (Suckau et al., 2003) in positive ion reflector mode. Mass measurements were performed automatically through fuzzy logic-based software or manually. Each spectrum was calibrated internally with mass signals of trypsin autolysis ions to reach a typical mass measurement accuracy of ± 25 ppm. The measured tryptic peptide masses were transferred by means of the MS BioTools program (Bruker-Daltonics) as inputs to search the NCBI nr database using Mascot software (Matrix Science). When necessary, MS/MS data from the LIFT TOF/TOF spectra were combined with PMF data for database searches with a parent ion mass tolerance of 20–40 ppm and a fragment ion mass accuracy of 0.25–0.50 Da.

2.9. Plasminogen activation assays

Plasminogen activation was performed by measuring the amidolytic activity of generated plasmin in a test volume of 100 μ l. Plasminogen (5 μ g) was incubated at room temperature in PBS containing 0.6 mM plasmin substrate S2251 (Sigma) in the absence or presence of increasing amounts of TG (1–12 μ g). Plasminogen activation was initiated by the addition of 10 nM t-PA. In parallel assays, the generation of plasmin in the absence of t-PA was determined. Hydrolysis of the chromogenic substrate was monitored by measuring absorbance at 405 nm.

2.10. Plasminogen binding on the surface of *S. bovis* worms

Intact parasites, some of them fixed in 10% buffered formalin solution for 24 h and other unfixed and only washed with PBS were incubated for 2 h at room temperature with 10 μ g/ml of human plasminogen diluted in PBS containing 1% BSA. After four washes with PBS, they were incubated with 10 μ g/ml of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-human plasminogen antibody conjugated overnight at 4 °C in the darkness. The worms were washed four times with PBS and analyzed by confocal microscopy with a Leica TCS NT microscope, using Argon 488 laser and Long Pass 515 filter. Adult schistosomes were analysed with a 10 \times Plan Floutar 0.3 NA dry objective and 5 μ m step sizes. Competition experiments were carried out by including 40 mM ϵ ACA during plasminogen binding. In parallel, control experiments were done in which the plasminogen, the anti-plasminogen antibody, or both were omitted.

3. Results

3.1. Plasminogen binding to tegument proteins (ELISA and ligand blotting)

By ELISA we observed that plasminogen bound to TG proteins and that the amount of plasminogen that bound to 1 μ g of TG protein increased with the amount of plasminogen added to the wells. In control wells, coated only with BSA, we observed a certain degree of non-specific binding of plasminogen (Fig. 1), which, however, was not observed in the 1D and 2D ligand blots (see below). In the competition experiments, the inclusion of 40 mM ϵ ACA inhibited plasminogen binding to TG. In these wells, the reactivity was identical to that observed in the control wells (Fig. 1).

In order to initiate the identification of the plasminogen-binding proteins, TG extracts were analysed by SDS-PAGE and by ligand blotting with plasminogen. Silver staining of the TG extract showed up the complexity of the protein composition of the extract and revealed at least 24 bands, of different intensities, with M_{Ws} between 17 and 116 kDa (Fig. 2).

Ligand blotting revealed at least 13 plasminogen-binding bands with M_{Ws} between 31 and 94 kDa. In the control strips, without TG or without plasminogen, no bands were revealed (Fig. 2).

3.2. 2D analysis of TG extracts and identification of plasminogen-binding proteins by mass spectrometry

Optimal separation of TG proteins in 2D-electrophoresis was achieved using 2D gels in two pH ranges, 5–8 and 7–10. In these gels, TG proteins were resolved into approximately 450 spots, with pIs between 5.5 and 9.6 and M_{Ws} between

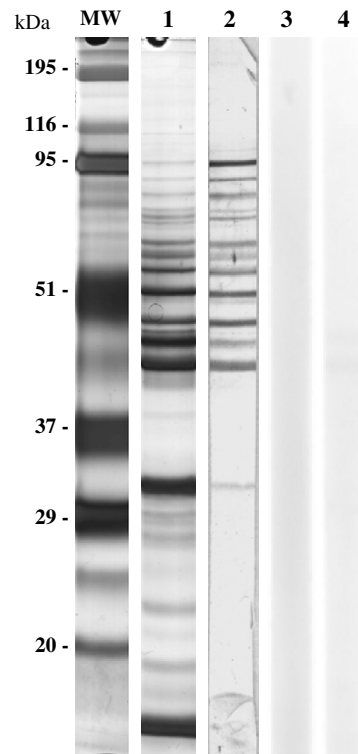


Fig. 2. SDS-PAGE of the TG extract and ligand blotting. Lane 1, silver staining of TG proteins; lane 2, ligand blot with 35 μ g/ml of plasminogen; lane 3, control ligand blot without TG; lane 4, control ligand blot without plasminogen.

15 and 144 kDa (Fig. 3A and B). In order to identify the plasminogen-binding spots, gels similar to the previous ones were transferred to nitrocellulose and subjected to ligand blotting with plasminogen. As shown in Fig. 3C and D, many spots with M_{Ws} between 29 and 88 kDa and pIs of 5.9–8.8 were revealed. In the control blots, in which plasminogen incubation was omitted, the anti-plasminogen antibody did not reveal any spots (not shown).

Matching the ligand blots with their homologous silver-stained gels allowed us to localise most of the spots that contained plasminogen-binding proteins in the 2D gels. We selected and cut 30 plasminogen-binding spots for MS analysis: 16 spots were cut from 2D gels in the 5–8 pH range (Fig. 3A), while the remaining 14 were cut from 2D gels in the 7–10 pH range (Fig. 3B).

Table 1 shows the results of the MS analyses. We identified 24 spots, corresponding to 10 proteins. The proteins identified were enolase, actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ATP:guanidino kinase, fructose biphosphate aldolase, phosphoglycerate mutase, triose-phosphate isomerase, adenylate kinase and two additional proteins similar to two hypothetical proteins of *Schistosoma japonicum*. All these proteins were identified by their similarity to the homologous proteins of other species of *Schistosoma* (*S. mansoni* and *S. japonicum*).

The spots most intensely revealed in the ligand blots corresponded to different isoforms of actin, enolase and GAPDH. We identified eight isoforms of enolase; 4 of

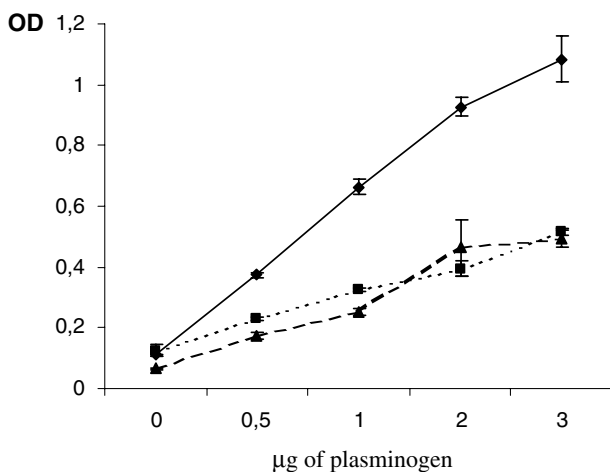


Fig. 1. Plasminogen binding to 1 μ g of TG extract of *Schistosoma bovis* measured over a range of plasminogen amounts using a microtitre plate method. (♦) Incubation with increasing amounts of plasminogen, 0–3 μ g. (■) Competition assay: 40 mM ϵ ACA was included during the incubation with plasminogen. (▲) Control wells without TG, coated only with BSA. Each point is the mean of three replicates \pm SD. The assay is typical of four experiments.

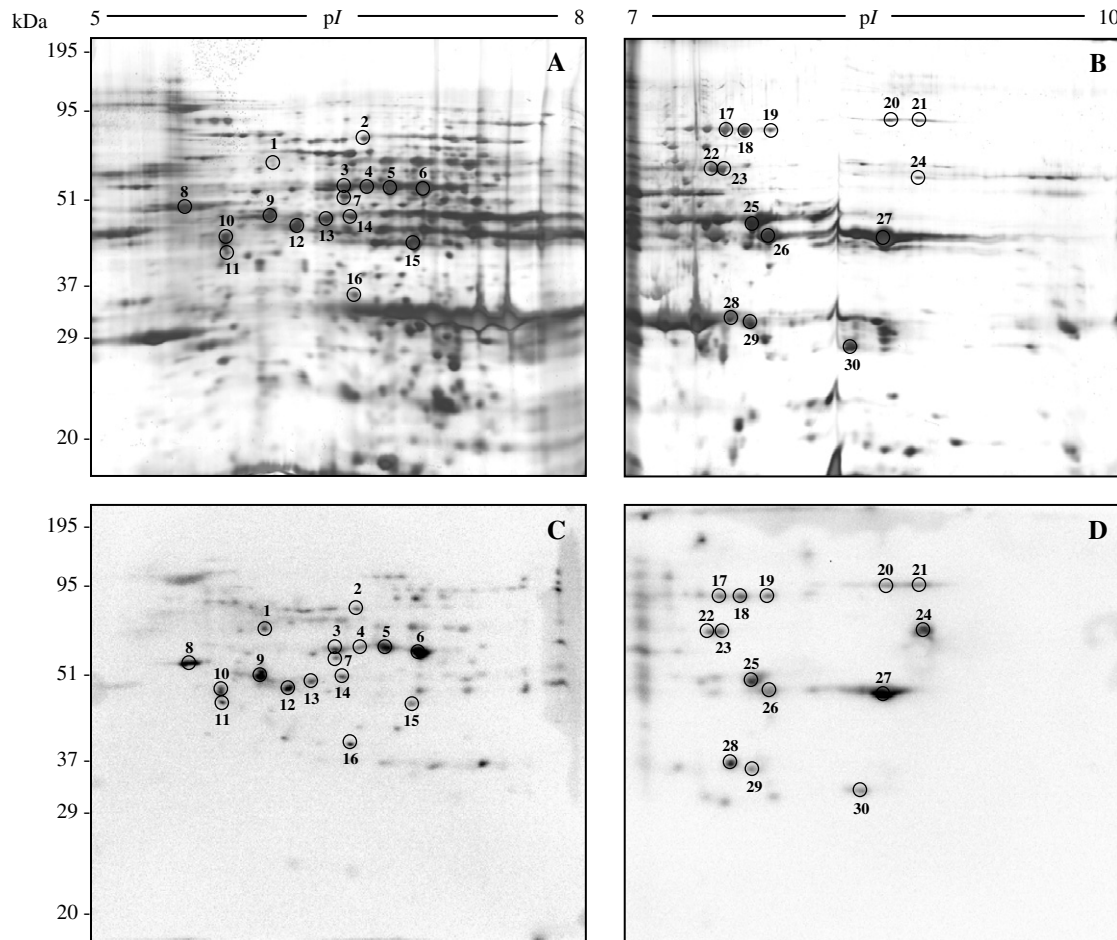


Fig. 3. Two-dimensional images of the TG extract from adult *Schistosoma bovis* worms. (A and B) Silver-stained gels of 12% polyacrylamide and pH ranges of 5–8 and 7–10. (C and D) Plasminogen-binding spots revealed on ligand blots from gels A and B. Numbers indicate the spots analysed by mass spectrometry.

actin; 3 of GAPDH, and 3 of ATP:guanidino kinase. The rest of the proteins were only identified in one spot each. The tryptic peptides of spots 1 and 16 matched the hypothetical proteins of *S. japonicum*. Spot 1 is annotated as glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Swiss-Prot/TrEMBL database), while owing to its similarity to an mRNA sequence of clone ZZD114 of *S. japonicum* (GenBank Accession No. AY223026), spot 16 may belong to the enzyme glioxalase I.

3.3. Plasminogen activation by the TG extract

We investigated whether the TG extract was able modify plasminogen activation by a physiologic activator and whether its components had the ability to generate plasmin on their own. To do so, increasing amounts of TG were added to a mixture of plasminogen and t-PA, and plasmin generation was measured. As can be seen in Fig. 4, the addition of TG (1–12 µg) enhanced activation by t-PA as compared to the activation obtained in the absence of TG (0 µg). Additionally, plasmin activity was detected in the absence of plasminogen activator, indicating that TG is capable of activating plasminogen on its own.

3.4. Plasminogen binding on the tegument surface

The tegument surface localisation of plasminogen ligands was determined by incubating intact adult worms with plasminogen and visualizing the binding by incubation with a FITC-labelled anti-plasminogen antibody, followed by confocal microscopic analysis and image sectioning. This study was performed with worms fixed in formalin and with unfixed worms, the same results being obtained in both cases. Projected images and sections clearly showed that plasminogen bound to the surface of adult males (Fig. 5). Plasminogen binding was observed on the ridges of the tegument along the whole of the male body. This binding was more intense on the anterior end, around the oral sucker (Fig. 5A, B, D and E). No plasminogen binding at all was observed in the female worms.

In the competition experiments we observed that plasminogen binding was completely inhibited by 40 mM of εACA, indicating that lysine-binding sites of plasminogen are involved in this interaction (Fig. 5C and F).

In the control experiments, in which incubation with plasminogen, with the antibody, or with both was omitted, no fluorescence signal was observed (data not shown).

Table 1
Identification of plasminogen-binding proteins of the TG by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry and NCBI database searching

Spot	Protein	Species	Accession No. (NCBI)	MW (kDa) Theo/exp	pI Theo/exp	Cover. %	MASCOT score
1	Hypothetical protein ^a	<i>S. japonicum</i>	AAW24823	60/68	6.8/6.3	4	120
3	Enolase ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/56	6.2/6.7	22	90
4	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/56	6.2/6.8	14	97
5	Enolase	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/56	6.2/6.9	16	86
6	Enolase	<i>S. japonicum</i>	P33676	48/56	6.2/7.1	24	125
7	Enolase ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/52	6.2/6.7	12	103
8	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/50	5.5/5.9	29	172
9	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/48	5.5/6.3	29	152
10	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/45	5.5/6.1	23	95
11	Enolase ^a	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/42	6.2/6.1	9	132
12	Actin	<i>S. mansoni</i>	AAA62377	42/46	5.5/6.4	18	113
13	Enolase ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.6	—	61
14	Enolase ^b	<i>S. mansoni</i>	AAC46886	47/48	6.2/6.7	—	82
15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^b	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/43	7.7/7.1	—	107
16	Hypothetical (Clone ZZD114 mRNA sequence) ^a	<i>S. japonicum</i>	AAP06049	33/36	6.5/6.8	12	97
17	ATP: guanidino kinase	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/82	8.1/7.7	19	120
18	ATP: guanidino kinase	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/82	8.1/7.8	34	208
19	ATP: guanidino kinase	<i>S. mansoni</i>	P16641	77/82	8.1/7.9	12	112
25	Fructose 1,6 bisphosphate aldolase	<i>S. mansoni</i>	AAA57567	40/46	7.4/7.8	49	225
26	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/7.9	21	90
27	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^a	<i>S. mansoni</i>	JL0121	37/44	7.7/8.6	17	134
28	Phosphoglycerate mutase ^a	<i>S. japonicum</i>	AAL30898	28/32	7.5/7.7	16	128
29	Triose-phosphate isomerase	<i>S. mansoni</i>	A38233	28/32	7.4/7.8	37	163
30	Adenylate kinase ^a	<i>S. mansoni</i>	P25824	23/29	8.8/8.4	35	134

Cover. %, sequence coverage; exp, experimental; theo, theoretical.

^a Spots identified using PMF data in combination with MS/MS data.

^b Spots unidentified using PMF data but identified using MS/MS data.

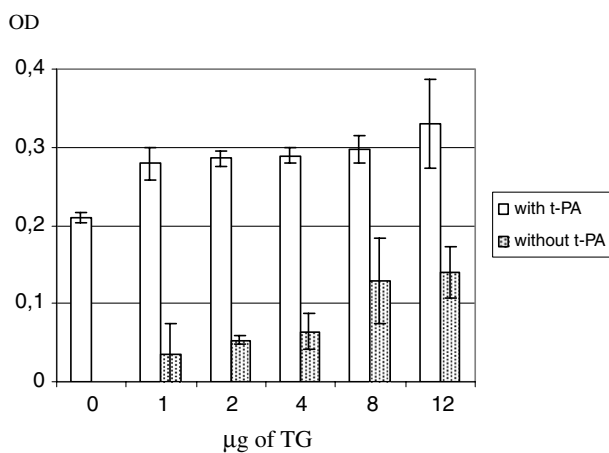


Fig. 4. Activation of plasminogen in the presence of tegumental proteins of adult *Schistosoma bovis* worms. (□) 10 nM t-PA was added to mixtures containing 5 µg of plasminogen, 0.6 mM S2251, and increasing amounts of TG proteins (0–12 µg). (▨) No t-PA was added to reaction mixtures. Each point is the mean of three replicates ± SD.

4. Discussion

The aim of the present work was to investigate the interactions of *S. bovis* with host haemostatic mechanisms; in particular the fibrinolytic system. The study was carried out with intact adult worms and with an extract (TG) that contained the proteins expressed by the adult worms on their

tegument surface. These proteins, which are exposed to the host during infection, could interact with plasminogen, a plasma glycoprotein that is the central component of the fibrinolytic system.

Here, we demonstrate that adult *S. bovis* worms express plasminogen-binding proteins in their tegument. For plasminogen binding to be biologically relevant, these plasminogen-binding proteins must be exposed on the surface of the worm. Immunofluorescence studies and later confocal microscopy revealed the plasminogen effectively bound to the tegument surface and that this only occurred in the males, and not in the females. In addition, the plasminogen binding on the surface of the tegument was strongly dependent on lysine residues, as is also the case for other fungal, bacterial, protozoan and human systems (Boyle and Lottenberg, 1997; Avilan et al., 2000; Crowe et al., 2003; Almeida et al., 2004). The fact that the females do not bind plasminogen can be explained in terms of the notion that they live in the gynaecophoric canal of the males and hence, at least in principle, would not need to develop mechanisms to prevent the formation of clots on their surface.

In this study, it is also shown that the TG extract increases plasmin generation by t-PA, in a similar way to that observed in other parasites such as *T. cruzi* and *Leishmania mexicana* (Avilan et al., 2000; Almeida et al., 2004). We do not know the mechanism by which the TG molecules exert this enhancing effect. Notwithstanding, it is known that the interaction of plasminogen with certain

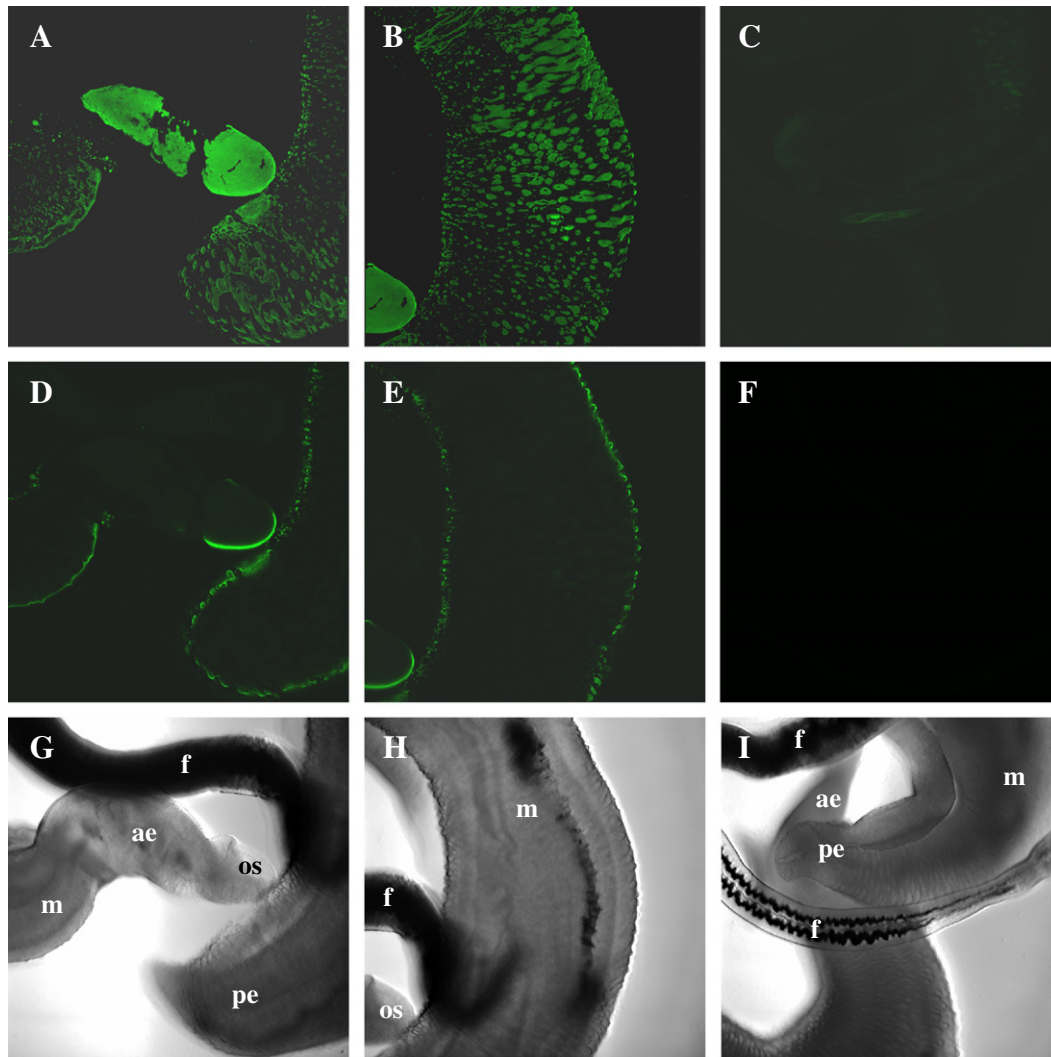


Fig. 5. Plasminogen binding on the surface of adult *S. bovis* worms as shown by immunofluorescence staining and confocal microscopy. (A–C) Projected images derived from sections generated by the confocal microscope; (D–F) confocal microscope sections from the middle plane of each specimen; (G–I) the corresponding transmitted light images of (D–F). (C and F) Show the results of the competition experiments: the addition of 40 mM ϵ ACA during the plasminogen incubation step completely abolished plasminogen binding. ae, anterior end; f, female; m, male; os, oral sucker; pe, posterior end.

molecules results in large conformational changes that enhance the ability of t-PA to generate plasmin (Anglés-Cano, 1994). It should also be noted that the TG extract is able to induce plasmin generation on its own.

Proteomic analysis of the TG extract allowed us to identify 10 proteins that act as ligands for plasminogen. Since the genome of *S. bovis* has not been sequenced, the identification of these proteins has been possible by cross-species comparison with other schistosomes whose genomes have been wholly (*S. mansoni*) or partly (*S. japonicum*) sequenced (Wilson et al., 2004; Barrett et al., 2005).

Orthologues of all this proteins identified in *S. bovis*, except the two hypothetical proteins of *S. japonicum* (AAW24823 and AAP06049, Table 1), have been identified in the tegument of *S. mansoni* (van Balkom et al., 2005; Braschi et al., 2006) and/or *S. japonicum* (Liu et al., 2006).

The most prominent spots on the 2D ligand blots corresponded to isoforms of enolase, GAPDH and actin. Of these proteins, enolase is the one that has been best characterised as a plasminogen receptor.

Enolase is a multifunctional glycolytic protein that belongs to a novel class of surface proteins that do not possess classical machinery for surface transport and yet are transported on the cell surface through an unknown mechanism (Pancholi, 2001). Enolase has been characterized as a plasminogen-binding protein on the surface of several pathogens, and this interaction with plasminogen has been shown to induce fibrinolytic activity and to be involved in invasiveness within the host (Bergmann et al., 2001; Jong et al., 2003). In helminths it has also been identified as a plasminogen-binding protein in the excretion–secretion products of *F. hepatica* and in several tissues of *Onchocerca volvulus* (Jolodan et al., 2003; Bernal et al., 2004). In the TG of *S. bovis*, we identified eight plasmino-

gen-binding isoforms of enolase. In recent studies it has been shown that the four isoforms showing the same M_{WS} and different pI s (spots 3, 4, 5 and 6) are recognised by the sera of sheep infected with *S. bovis*, while the other four isoforms are not antigenic and differ in both their M_{WS} and their pI s (spots 7, 11, 13 and 14) (Pérez-Sánchez et al., 2006).

GAPDH is also a glycolytic enzyme and a non-classic surface protein of several bacterial species. GAPDH is a major plasminogen-binding protein in bacterial and fungal cells (Crowe et al., 2003; Bergmann et al., 2004). A recombinant GAPDH form from the filarial parasite *O. volvulus* has also been reported to bind plasminogen (Erttmann et al., 2005). In the tegument of *S. bovis*, we identified three isoforms of GAPDH that bind plasminogen, of which only two were antigenic (spots 26 and 27), as has been described recently (Pérez-Sánchez et al., 2006).

According to Braschi et al. (2006), the presence of glycolytic enzymes—such as enolase and GAPDH—in the tegument of the schistosomes could utilise incoming glucose for ATP production required for functions such as nutrient or solute uptake, or for changes in cytoskeletal conformation.

Actin, one of the most abundant cellular proteins, is found in all eukaryotic cells and for some time it has been known to bind to plasminogen kringle regions and to accelerate plasmin generation by t-PA (Lind and Smith, 1991). In schistosomes, it forms part of the myofibrils of the tegument and it is the major component of the spines of the surface of the worms (Jones et al., 2004). In *S. bovis*, we detected four isoforms of actin that bound plasminogen and, as has been reported recently (Pérez-Sánchez et al., 2006), they were not recognised by the host immune system. In that same work, we also reported that the tegument of *S. bovis* contains another two isoforms of actin that, in contrast, are antigenic but that, according to the present results, do not bind plasminogen.

This multiplicity of isoforms of enolase, GAPDH and actin, some of which are not antigenic, suggests that *S. bovis* could use paralogues of essential enzymes when they are targeted by the immune system in order to prevent loss of function, in a similar way to that suggested for *S. mansoni* (Verjovski-Almeida et al., 2003).

Other proteins identified in this study were ATP:guanine kinase, triose-phosphate isomerase, adenylate kinase, fructose biphosphate aldolase, and phosphoglycerate mutase. The latter two have also been identified in the wall of *C. albicans*, where they bind and enhance the activation of plasminogen (Crowe et al., 2003). Regarding the rest of the proteins identified, this is the first time they have been reported to bind plasminogen.

This study represents the first report about the interactions of plasminogen with schistosome proteins. We demonstrate that plasminogen binds to the tegument surface of male *S. bovis* worms and that a protein extract of the tegument has the capacity to initiate plasmin generation and to enhance plasmin generation by t-PA. These observations are consistent with the hypothesis that male *S. bovis* worms

would use host plasminogen to prevent blood clotting around them.

We have also identified a range of proteins from the tegument of *S. bovis* adult worms that bind plasminogen. We are unaware of which of these proteins might have biological significance as plasminogen receptors *in vivo*. This role requires their expression on the outer tegument surface of the worm. Consequently, further investigation will be required to determine which of these proteins are exposed to the host blood and to establish the physiological role of their interaction with plasminogen.

Acknowledgments

We thank Dr. Emilio Cervantes of the Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología of Salamanca (CSIC) (Spain) for his assistance in performing the confocal microscope analyses; Dr. Emilio Camafeita Fernández from the Proteomic Unit of the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares of Madrid (Spain) for his assistance in MS analyses and N. Skinner for supervising the English version of this manuscript. This research was supported by Grant AGL2003-04235 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

References

- Abath, F.G., Werkhauser, R.C., 1996. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunology* 18, 15–20.
- Agnew, A.M., Murare, H.M., Lucas, S.B., Doenhoff, M.J., 1989. *Schistosoma bovis* as an analogue of *S. haematobium*. *Parasite Immunology* 11, 329–340.
- Almeida, L., Vanegas, G., Calcagno, M., Concepción, J.L., Avilan, L., 2004. Plasminogen interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 63–67.
- Anglés-Cano, E., 1994. Overview on fibrinolysis: plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chemistry and Physics of Lipids* 67/68, 353–362.
- Avilan, L., Calcagno, M., Figuera, M., Lemus, L., Puig, J., Rodriguez, A.M., 2000. Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen-plasmin system. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110, 183–193.
- Barrett, J., Brophy, P.M., Hamilton, J.V., 2005. Analysing of proteomic data. *International Journal for Parasitology* 35, 543–553.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S., 2001. α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* 40, 1273–1287.
- Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., 2004. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infection and Immunity* 72, 2416–2419.
- Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S., Morcilla, A., 2004. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory–secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters* 563, 203–206.
- Boyle, M.D.P., Lottenberg, R., 1997. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thrombosis and Haemostasis* 77, 1–10.
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Verjovski-Almeida, S., Wilson, A., 2006. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics* 6, 1471–1482.

- Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.M., Gow, N.A.R., Booth, N.A., 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular Microbiology* 47, 1637–1651.
- De Bont, J., Vercruysse, J., 1998. Schistosomiasis in cattle. *Advances in Parasitology* 41, 285–364.
- DeMarco, R., Kowaltowski, A.T., Mortara, R.A., Verjovski-Almeida, S., 2003. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307, 831–838.
- Erttmann, K.D., Kleensang, A., Schneider, E., Hammerschmidt, S., Büttner, D.W., Gallin, M., 2005. Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*On*-GAPDH). *Biochimica et Biophysica Acta* 1741, 85–94.
- Goguen, J., Bugge, T., Degen, J.L., 2000. Role of the pleiotropic effects of plasminogen deficiency in infection experiments with plasminogen-deficient mice. *Methods* 21, 179–183.
- Jolodan, A., Fisher, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S., Brattig, N.W., 2003. Molecular cloning of an α -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochimica et Biophysica Acta* 1627, 111–120.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P., McManus, D.P., 2004. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Bioessays* 26, 752–765.
- Jong, A.Y., Chen, S.H.M., Stins, M.F., Kim, K.S., Tuan, T., Huang, S., 2003. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology* 52, 615–622.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P., Korhonen, T.K., 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 531–552.
- Lind, S.E., Smith, C.J., 1991. Actin accelerates plasmin generation by tissue plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* 266, 17673–17678.
- Liu, F., Lu, J., Hu, W., Wang, S.Y., Cui, S.J., Chi, M., Yan, Q., Wang, X.R., Song, H.D., Xu, X.N., Wang, J.J., Zhang, X.L., Zhang, X., Wang, Z.Q., Xue, C.L., Brindley, P.J., McManus, D.P., Yang, P.Y., Feng, Z., Chen, Z., Han, Z.G., 2006. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathogens* 2, e29.
- Mahmoud, A.A.F., 2001. Schistosomiasis. Imperial College Press, London.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D., Selkirk, M.E., 1991. Parasite Antigen Parasite Genes: A Laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87, 206–210.
- Pancholi, V., 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 902–920.
- Pearce, E.J., MacDonald, A.S., 2002. The immunology of schistosomiasis. *Nature Reviews* 2, 499–511.
- Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2006. Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics* 6, S226–S236.
- Plow, E.F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L.A., Hoover-Plow, J.L., 1995. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB Journal* 9, 939–945.
- Ruppel, A., Kennedy, M.W., Kusel, J.R., 2002. Schistosomiasis immunology, epidemiology and diagnosis. *Trends in Parasitology* 18, 50–52.
- Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68, 850–858.
- Stanley, R., Ngaiza, J.R., Wambay, E., Lewis, J., Doenhoff, M.J., 2003. Platelets as an innate defence mechanism against *Schistosoma mansoni* infections in mice. *Parasite Immunology* 25, 467–473.
- Stochaj, W.R., Berkelman, T., Laird, N., 2003. Preparative two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients. In: Simpson, R.J. (Ed.), *Proteins and Proteomics a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 143–218.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 952–965.
- van Balkom, B.W., van Gestel, R.A., Brouwers, J.F., Krijgsveld, J., Tielens, A.G., Heck, A.J., van Hellemond, J.J., 2005. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. *Journal of Proteome Research* 4, 958–966.
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E.A., Guimaraes, P.E., Ojopi, E.P., Paquola, A.C., Piazza, J.P., Nishiyama Jr., M.Y., Kitajima, J.P., Adamson, R.E., Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R.A., Malaquias, L.C., Marques, R.C., Miyasato, P.A., Nascimento, A.L., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M.A., Sa, R.G., Stukart, G.C., Soares, M.B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira, A.M., Wilson, R.A., Menck, C.F., Setubal, J.C., Leite, L.C., Dias-Neto, E., 2003. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetic* 35, 148–157.
- Wilson, R.A., Curwen, R.S., Braschi, S., Hall, S.L., Coulson, P.S., Ashton, P.D., 2004. From genomes to vaccines via the proteome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 45–50.